

LA RÉACTION
CYTO-CHIMIQUE
DE DUBOS
TEST DE VIRULENCE
POUR
LES MYCOBACTÉRIES

(Travail du Laboratoire de la Tuberculose
de l'Institut Bactériologique de Lyon)

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 10 Juin 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jean TIGAUD

Ancien Externe des Hôpitaux de Lyon

Né le 26 Septembre 1924, à LYON (Rhône)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Editeurs

42, quai Gailleton, 42

—
1953

LA REACTION CYTOCHIMIQUE DE DUBOS
TEST DE VIRULENCE POUR LES MYCOBACTERIES

LA RÉACTION
CYTO-CHIMIQUE
DE DUBOS
TEST DE VIRULENCE
POUR
LES MYCOBACTÉRIES

(Travail du Laboratoire de la Tuberculose
de l'Institut Bactériologique de Lyon)

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 10 Juin 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jean TIGAUD

Ancien Externe des Hôpitaux de Lyon

Né le 26 Septembre 1924, à LYON (Rhône)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Editeurs

42, quai Gailleton, 42

1953

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire
Doyen
Assesseur

M. J. LEPINE.
M. HERMANN.
M. GATE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, VILLARD, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART,
PIERY, CADE, PATEL, FAVRE, LEPINE, SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND

PROFESSEURS

Clinique médicale A
Clinique médicale B
Clinique chirurgicale A
Clinique chirurgicale B
Clinique médicale infantile et hygiène du 1^{er} âge
Clinique ophtalmologique
Clinique d'oto-rhino-laryngologie
Clinique urologique
Clinique et prophylaxie de la tuberculose
Clinique dermatologique et syphiligraphie
Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
Clinique gynécologique
Clinique obstétricale
Clinique stomatologique
Histologie
Pharmacie et Pharmacologie
Botanique et Cryptogamie
Physiologie
Anatomie pathologique
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie
Médecine du travail
Parasitologie et Pathologie exotique
Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
Chimie organique et Toxicologie
Pathologie générale et expérimentale
Hydrologie thérapeutique et Climatologie
Anatomie
Pathologie interne
Chimie biologique et médicale
Pathologie chirurgicale
Biologie médicale
Pharmacie galénique
Médecine légale et Déontologie
Thérapeutique
Hygiène
Propédeutique chirurgicale

MM. FROMENT.
P. RAVAUULT
SANTY.
WERTHEIMER.
BERNHEIM.
BONNET.
REBATTU.
CIBERT.
DUFOURT.
GATE.
DECHAUME.
SEDALLIAN.
GUILLEMINET.
POLLOSSON.
PIGEAUD.
DUCLOS.
NOEL.
LEULIER.
NETIEN.
HERMANN.
MARTIN J.-F.
PONTIUS.
(détaché à Beyrouth)
MAZEL.
GARIN.
ROCHET.
CHAMBON.
JOSSEMAN.
DELORE.
GABRIELLE.
CROIZAT.
ENSELME.
MALLET-GUY.
JOURDAN.
REVOL.
BOURRET.
LEVRAI.
SOHIER.
BERTRAND.



PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique..... M. BANSSILLON.

Pharmacie et Pharmacologie DREVON.

Chimie organique et Toxicologie BADINAND

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

Physique biologique BERGER.
Parasitologie COUDERT.

Parasitologie ROMAN.
Histologie TUSQUES

AGREGES EN EXERCICE

MM.
Pathologie médicale BRUN.
Pathologie médicale M. GIRARD.
Pathologie médicale P. GIRARD.
Pathologie médicale JEUNE.
Pathologie médicale VACHON.
Pathologie chirurgicale ... BERARD.
Pathologie chirurgicale ... DARGENT.
Pathologie chirurgicale ... DESJACQUES.
Pathologie chirurgicale ... LABRY.
Pathologie chirurgicale ... MANSUY.
Pathologie chirurgicale ... TRILLAT.
Pathologie chirurgicale ... GUILLET.
Obstétrique BROCHIER.
Obstétrique MAGNIN.
Anatomie pathologique ... GUICHARD.

MM.
Anatomie LATARJET
Neuro-chirurgie LECUIRE.
Oto-rhino-laryngologie ... MAYOUX.
Ophtalmologie PAUFIQUE.
Urologie PERRIN.
Dermato-syphiligraphie ... THIERS.
Médecine légale et Médecine du Travail ROCHE.
Chimie biologique R. CREYSSEL.
Bactériologie BERTOYE.

CHARGES DES FONCTIONS D'AGREGE

Hygiène COUTURE.
Physiologie CIER.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. SEDALLIAN ; Assesseurs : MM. ENSELME,
BRUN et CREYSSEL R.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

Ils m'ont toujours entouré d'une tendre sollicitude. Ils ont toujours fait leur possible pour m'aider à réaliser tous mes désirs, toutes mes ambitions.

Je leur dois le meilleur de moi-même.

A MA FEMME

Ma raison de vivre et d'espérer.

A MON FILS

Dont le sourire encore à peine ébauché m'a tant aidé à rédiger ce travail.

A Madame J. TAVIANI

Nous sommes devenu son petit-fils. Elle est pour nous toute indulgence.

A MES BEAUX-PARENTS

Quelle affection et quelle reconnaissance ne leur dois-je pas, pour avoir fait de ma femme ce qu'elle est !

A Madame et au Docteur Dominique ORSONI,
Ancien chef de travaux à la Faculté de Médecine.

La sympathie qu'il nous avait inspirée comme
chef de travaux s'est transformée en une sûre
affection lorsque nous sommes devenu son beau-
frère.

A Madame et à Monsieur Georges DESJARDINS

Ils ont accueilli leur beau-frère avec une
affection dont nous mesurons chaque jour tout
le prix.

A TOUTES MES PETITES NIECES

A TOUS MES PARENTS

A MES AMIS

A Monsieur le Professeur P. SEDALLIAN,
Directeur de l'Institut Bactériologique de Lyon.

Il nous a fait le très grand honneur de bien vouloir présider cette thèse.

Nous voudrions que notre travail honore cet Institut dont il dirige les destinées.

Malgré la sécheresse d'un exposé qui n'a voulu être que la mise au point d'une infime question de Bactériologie, nous voudrions que ces pages reflètent un peu l'Esprit qui anime son Enseignement.

A Monsieur le Professeur J. ENSELME

Nous avons apprécié, comme candidat au certificat d'Etudes spéciales de Biochimie classique, son souci constant de s'élever des questions de détail aux idées générales.

Depuis qu'Il nous a fait le très grand honneur de nous accepter dans son Laboratoire, nous apprécions chaque jour son extrême courtoisie, l'intérêt humain qu'Il porte à chacun de ses collaborateurs et l'éclectisme de son savoir.

A Monsieur le Professeur agrégé J. BRUN

Ce travail a été commencé dans le Laboratoire de son service. Nous avons passé à ses côtés plus d'un an dans l'enthousiasme spirituel que peut être celui d'un jeune externe assurant constamment la liaison de la Clinique au Laboratoire.

Si nous avons pu appliquer à la Clinique journalière les données un peu théoriques que nous exposons, nous aurions sans doute mieux reflété la Pensée de notre Maître, Clinicien à qui n'échappe aucun des thèmes scientifiques guidant actuellement la Recherche.

A Monsieur le Professeur agrégé R. CREYSSEL

Sa bienveillance à notre égard n'a eu d'égale que son extrême délicatesse, il nous a inlassablement prodigué son aide et ses conseils, souvent sollicités, sans jamais marquer la moindre impatience.

Il nous offre journallement un magnifique exemple des qualités du chercheur et du médecin.

Au Docteur J. VIALLIER,
*Chef du Service de la Tuberculose
à l'Institut Bactériologique de Lyon.*

Il a bien voulu nous permettre de travailler à ses côtés durant trois ans et demi. Nous avons trouvé auprès de lui un Maître dont les conseils éclairés ont fait progresser notre travail, nous ont évité de nombreux faux pas. Sa courtoisie à notre égard ne s'est jamais démentie. Il nous a donné le goût de cette difficile bactériologie qu'est celle des Mycobactéries, au point que nous souhaitons ne jamais voir cesser ces communes recherches qui font l'objet de ce travail.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Professeur P. RAVAUT

Il fut l'alpha et l'omega de notre carrière hospitalière puisque hypo de fondation de son service, nous eûmes le privilège de terminer notre externat chez lui.

Son goût d'une clinique moderne et jeune, toujours nuancé d'un sens exact de la mesure, fit notre admiration. Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre vive reconnaissance et notre profond attachement pour les conseils paternels qu'il nous a toujours prodigués.

A NOS MAITRES DE L'EXTERNAT

Professeur agrégé J. BRUN (deux semestres)

Professeur P. BONNET

Professeur J. REBATTU

Professeur P. CROIZAT

Professeur P. RAVAUT

A NOS CONFERENCIERS DE L'EXTERNAT

Docteur M. LEHMANN

Docteur J. SCHNEPP

A Madame P. CHAIX,

Maître de conférences à la Faculté des Sciences.

Le médecin qu'elle est profondément demeuré nous a réservé à la Faculté des Sciences, un accueil dont nous lui serons toujours reconnaissant.

C'est elle qui nous a signalé la Réaction de Duibet à un moment où nous ne soupçonnions même pas son existence.

Au Docteur E. COUTURE,

Chef de travaux à la Faculté de Médecine.

Des que nous avons fait sa connaissance nous avons bénéficié de la même amitié qu'il accorde à son ancienne élève, notre femme.

Il ne pouvait plus nous honorer tous deux.

LA REACTION CYTOCHIMIQUE DE DUBOS TEST DE VIRULENCE POUR LES MYCOBACTERIES

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

La virulence, « le caractère le plus labile et le plus fragile des germes » selon certains bactériologistes, exige, en général, pour sa recherche, souvent longue, toujours délicate, de nombreux soins et des essais comparatifs. Cette détermination prend un intérêt singulier pour la classification des Mycobactéries dont les souches, si diverses se distinguent souvent par ce seul caractère.

Pourtant la recherche de la virulence sur l'animal est ici pleine d'aléas en raison de la lenteur d'apparition des phénomènes pathologiques qui expose l'expérimentateur à voir surgir des épizooties dans un élevage forcément important et qui, bien plus, rend douteuse la régularité des conditions d'habitat et de régime au cours des essais.

Le clinicien ne peut porter qu'un intérêt rétrospectif à une recherche aussi longue dont l'intérêt est ainsi limité. D'ailleurs, quel animal choisir ? un bacille tuberculeux de type humain par exemple ne tue pas forcément le lapin et nous savons, selon HAUDUROY, que le B.C.G. avirulent pour l'homme et de toutes les espèces animales détermine pourtant des lésions chez le Hamster. Nous connaissons même des Mycobactéries parasites des plantes dont le pouvoir pathogène animal est nul.

Ces difficultés n'ont du reste pas échappé aux chercheurs ainsi qu'en fait foi la somme de travaux concernant la mesure de la virulence par inoculation. Mais cette mesure entre dans une nouvelle voie en 1948 : R. Dubos et

Y. MIDDLEBROOK décrivent « la réaction cytochimique au Rouge Neutre test de virulence » et aux méthodes biologiques longues, délicates valables en somme pour une seule espèce animale, vient se substituer une méthode rapide et surtout indépendante de toutes variations d'espèce et d'individus auxquelles sont exposés les résultats des méthodes biologiques.

Cet élégant procédé se montrait-il fidèle ? HAUDUROY qui l'a introduit en Europe le pense. J. VIALIER et nous-même étudions un certain nombre de souches. D. RICHMONT et CUMINGS font quelques réserves, F. INGRAO et C. VETERE donnent un avis favorable.

Mais l'opinion des auteurs sur le mécanisme de cette réaction a divergé et ASSELINEAU et LEDERER attribuent les premiers à l'Acide Mycolique et à un « lipopolysaccharide azoté et phosphoré » le pouvoir de déterminer cette réaction alors que PARAFF et DESBORDES voient d'abord dans cette coloration le virage d'un indicateur Redox, rapprochant la réaction de DUBOS de celle de BLOCH, puis se rangent implicitement à l'avis d'ASSELINEAU et LEDERER en faisant intervenir les groupements acides des cires. Notons du reste que depuis quelques années les chercheurs se sont intéressés à la détermination *in vitro* de la virulence, indépendante, répétons-le, de tout test animal et nous ont fourni les méthodes de PARAFF et DESBORDES avec le Bleu de Nil, comparable à la réaction de DUBOS, au Rouge Neutre, de DUBOS, MIDDLEBROOK et PIERCE avec la morphologie en cordes des bacilles, de BLOCH avec le Bleu de Méthylène.

Citons encore, à part, la résistance au P.A.S. et à l'Isoniazide, tests curieux, puisqu'ils nous font en somme rencontrer dans la même catégorie les germes les plus inoffensifs et les plus dangereux.

Nous avons donc l'intention de présenter ici l'essentiel de ce que nous savons sur la Réaction de DUBOS en nous appuyant à la fois sur ce que nous ont appris différents auteurs et sur diverses expériences personnelles

réalisées pour la plupart à l'Institut Bactériologique de Lyon, dans le service de la Tuberculose, placé sous la bienveillante autorité du Docteur VIALIER.

Nous envisagerons successivement la technique et la spécificité de la Réaction de DUBOS, ses variations et son mécanisme.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE DE LA REACTION DE DUBOS

Avant d'aborder la technique de la Réaction de DUBOS nous tenons à préciser un détail extrêmement important, à notre avis, concernant l'utilisation même de la Réaction de DUBOS. Il ne s'agit en effet nullement d'une coloration bactérienne susceptible de permettre l'identification des germes, ne serait-ce qu'en raison des grandes différences de coloration qu'on observe entre diverses souches de Mycobactéries et avant de pratiquer une réaction de DUBOS il est indispensable de pratiquer toutes les recherches bactériologiques classiques nous permettant de s'assurer que l'on est bien en présence d'une culture non contaminée (au moins de façon massive) de Mycobactéries.

Ajoutons que la seule réaction de DUBOS pratiquée suivant la technique classique nous a paru insuffisante pour certaines de nos recherches ; nous avons donc été amené à rechercher d'autres techniques que nous décrirons à la suite de la technique classique.

I. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION DE DUBOS « classique ».

La technique originale de la réaction de DUBOS [1] comporte le lavage des bacilles dans de l'alcool méthylique à 50 % puis la mise en suspension des bacilles pendant vingt minutes au minimum dans un tampon alcalin au véronal, additionné d'une certaine quantité de Rouge Neutre en solution aqueuse au 1/1.000^e.

Nous avons été conduit à modifier cette technique par des retouches de détail que nous voulons exposer afin de préciser le plus possible nos conditions expérimentales et de faire part de quelques remarques que cette technique nous a suggérées.

A. — *Réactifs :*

1° *Méthanol ; eau distillée parties égales.* Notons à ce sujet qu'il n'est pas indifférent d'utiliser n'importe quel alcool méthylique : l'alcool méthylique pur donne de bons résultats ; l'alcool méthylique « technique » donne à cette dilution soit un louche immédiat, soit un louche lors de son adjonction aux bacilles. Il sort évidemment du cadre de cette étude de préciser la nature de ce louche mais nous tenions à le signaler.

2° *Solution de Rouge Neutre au 1/1.000^e, dans l'eau distillée.* Quoi qu'on ait dit sur l'instabilité des solutions d'indicateurs REDOX en général, cette solution est d'assez bonne conservation à l'obscurité (un mois environ). Une solution de deux mois donne aux bacilles une teinte plus cuivrée qui permet encore l'examen par comparaison de deux souches. Son emploi n'est cependant pas à conseiller.

3° *Solution tampon :*

Acide borique	0,62 g.	} pH = 8,9
K Cl	0,74 g.	
Na OH N/10	37,6 cc.	
Eau distillée q.s.p.	200 cc.	

L'acide borique est desséché à l'air. Le chlorure de potassium l'est à l'étuve à 100°.

Dissoudre d'abord l'acide borique dans la soude et 50 cc. environ d'eau distillée. Ajouter ensuite le chlorure de potassium et compléter.

Ce tampon est conforme, quant au p.H. à celui indiqué par DUBOS et MIDDLEBROOK et HAUDUROY [2]. Il diffère quant à sa nature. Ces auteurs utilisent un tampon véronal. HAUDUROY indique que les résultats sont indépendants de la nature du tampon.

Enfin DESBORDES et FOURNIER [3] indiquent un tampon véronal de pH un peu différent $\text{pH} = 8,7$.

B. — *Technique de la réaction :*

On part d'une culture de Mycobactéries sur milieu liquide ou solide. Les deux modes de culture sont utilisables.

Si l'on part d'une culture en milieu liquide on centrifuge préalablement les bacilles avant de les mettre en présence de Méthanol à 50 %.

Si l'on part d'une culture en milieu solide on dissocie rapidement les colonies prélevées (plusieurs colonies d'âge et d'aspect différents de préférence) dans le Méthanol à 50 %.

On procède à deux ou mieux trois lavages successifs des bacilles dans le Méthanol en centrifugeant chaque fois et en remettant chaque fois en suspension dans du Méthanol neuf. Pour un culot du diamètre d'une tête d'épingle en verre 4 à 5 cc. de liquide chaque fois suffisent largement. Il ne faut pas craindre de centrifuger longuement chaque fois ne serait-ce que pour assurer une adhérence suffisante d'un culot souvent de dimension réduite qu'on risque de perdre au moment de la décantation.

Puis, après le dernier lavage et un essorage soigneux des bacilles, on met ces derniers en suspension dans une solution extemporanée comprenant $1/20^{\circ}$ de cc. de solution de Rouge Neutre pour 1 cc. de tampon (1 goutte par cc.) ; 4 à 5 cc. dans les mêmes conditions que ci-dessus suffisent très largement. A ce pH alcalin la solution ainsi obtenue est jaune foncé.

On laisse en contact un temps fixe de vingt minutes en prenant soin d'agiter de temps en temps pour assurer une coloration homogène car les gros amas bacillaires sédimentent vite. Puis on centrifuge 10 minutes à 5.000 tours-minute. On jette la presque totalité du liquide surnageant, ne gardant qu'une goutte ou deux pour émulsionner le culot. On met cette émulsion entre lame et

lamelle et l'on examine successivement avec un objectif moyen qui permet de situer les grosses colonies, les plus petites, les corps étrangers grossiers. Puis on passe à l'objectif fort à sec.

Disons encore qu'il n'est aucunement question d'une coloration d'identification de germes ; pour peu qu'on ait affaire à des germes peu virulents ou non virulents, leur morphologie devient difficile à préciser, l'intensité des teintes obtenues n'est en rien comparable au beau rouge du ZIEHL. Cette réaction ne permet pas la recherche de germes dans un produit pathologique ; ce n'est pas non plus le but.

Mais nous avons dit combien variable apparaissait la coloration des germes. HAUDUROY (loc. cité) déjà nous avait indiqué que parmi les germes prenant le Rouge Neutre apparaissaient de sensibles différences d'affinités tinctoriales. Nous avons voulu réaliser la comparaison des germes ainsi classés virulents d'une façon plus objective que par le simple examen microscopique.

On peut en effet, grossièrement, sur la foi de cet examen ainsi pratiqué, classer les germes en germes très virulents, peu virulents, de virulence moyenne. Mais nous ne croyons pas qu'il soit possible, même pour un observateur entraîné, d'affirmer à plusieurs semaines de distance que tel germe est plus virulent que tel autre sauf s'il s'agit de différences grossières. D'autre part, on n'examine ainsi que des colonies en nombre forcément restreint. Or c'est sur la virulence actuelle d'une souche donnée, faite d'une sommation d'un grand nombre de germes, que nous désirons être fixés et non pas sur la virulence d'un seul germe, ni même sur celle d'une colonie.

II. — TECHNIQUE SPECTROSCOPIQUE DE LA RÉACTION DE DUBOS.

Nous avons voulu nous aider alors d'un examen spectroscopique. Nous voulions initialement chercher si le « Rouge » du Rouge Neutre correspondait à une bande

d'absorption précise dans le vert. L'étalement de la bande caractéristique de la réaction positive nous aurait permis de nuancer en les chiffrant, nos réponses. Mais nos espoirs ont été déçus. Lorsqu'on examine la lumière transmise par une purée bacillaire traitée par le Rouge Neutre, on observe une absorption continue du violet au vert. En accroissant l'intensité de la source, en diminuant l'épaisseur de bacilles, on réduit cette absorption continue en faisant apparaître successivement le vert et le bleu, mais on ne peut isoler une bande spectrale définie.

Pourtant cet examen spectroscopique nous a permis, croyons-nous, une classification plus rationnelle de nos souches virulentes. Il suffit simplement de ne considérer que la limite du côté du rouge de cette absorption continue, dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques d'un examen à l'autre. Nous avons ainsi comparé la même souche au cours de repiquages successifs à plusieurs mois d'écart, et pour certaines d'entre elles, plus d'un an après l'examen initial. Nous avons ainsi classé nos germes d'après une longueur d'onde d'absorption plus objective que le seul examen entre lame et lamelle. Le principal avantage de cette technique est de permettre la comparaison des résultats expérimentaux éloignés dans le temps. C'est pourquoi nous croyons utile de rappeler ici la technique et l'appareillage que nous avons proposé avec J. VIALIER [4].

L'appareillage comporte comme source de lumière une lampe à arc dont le faisceau lumineux est orienté par des condensateurs, il traverse un diaphragme de 4 mm. de diamètre en arrière duquel est placée une cellule contenant la purée microbienne examinée. La cellule est constituée de deux disques de verre optiquement plans, séparés par des cales annulaires de 5, 4, 3, 2, 1 dixièmes de mm. d'épaisseur. C'est dans l'espace libre, compris entre les faces de verre que l'on dispose au cours du montage, la purée bacillaire que l'on se propose d'examiner : on réalise une réaction de DUBOS dans les conditions que

nous venons d'indiquer à propos de la Réaction de DUBOS classique, mais sur un beaucoup plus grand volume bacillaire et, bien entendu, avec des quantités de réactifs correspondantes. On pratique une centrifugation en fin de réaction et on égoutte soigneusement le tube à centrifuger. On recueille alors à la spatule le culot que l'on écrase entre les faces de verre. Ce procédé exige évidemment une quantité importante de bacilles. Nous avons obtenu des récoltes suffisantes soit par culture sur LÆWENSTEIN, soit par culture en milieu de YOUNG-SÉRUM de cheval 30 cc. Nos examens ont toujours été effectués après plus de 40 jours de culture pour éviter l'examen de bacilles immatures.

Nous examinons chaque souche sous les cinq épaisseurs indiquées avec un spectroscope à vision directe, et notons pour chaque examen la limite du côté du vert de la bande d'absorption.

Nous exposerons nos résultats au cours de l'étude de la réaction par ce procédé et par le précédent.

Cette technique est loin d'être parfaite et quelques-unes de ces imperfections nous sont apparues d'emblée. Certaines tiennent au procédé lui-même.

La nécessité d'une quantité importante de bacilles rend cet examen coûteux, voire même dangereux ; les purées bacillaires constituent un milieu très diffusant qui supprime sans nul doute de fines modifications du spectre. Il serait sans aucun doute souhaitable de pouvoir effectuer une colorimétrie sur un liquide d'extraction, cette dernière réalisée de telle sorte que nous obtenions des résultats quantitatifs. Mais la chimie des cires nous a semblée trop ardue pour que nous osions l'aborder sans matériel spécial. Il n'est pas sûr du reste que le procédé y gagne beaucoup en précision et, certainement, il s'agirait d'une complication notable de l'examen.

D'autres critiques iront à l'appareillage : une lampe à arc n'est pas la meilleure source possible de lumière vive. C'était, cependant, la seule source de lumière intense

dont nous disposions. D'autre part, les résultats fournis ne valent que pour un seul montage et avec un autre équipement il faudrait réétalonner l'instrument.

Ces défauts ne nous ont pas échappé. Toutefois telle que nous l'avons réalisée, cette installation nous a permis d'obtenir, pour les mêmes souches, des résultats si constants dans le temps (les mêmes souches ont été étudiées parfois avec un écart de plus d'un an et demi) que nous avons cru devoir attirer l'attention sur les services que peut rendre un tel dispositif dans les études de cette sorte.

III. — RÉACTION DE DUBOS SUR COLONIE REPÉRÉE.

Nous avons enfin, utilisé une troisième variante de la réaction de DUBOS qui dispense du lavage préalable des bacilles ; elle permet, en outre, de suivre pas à pas les modifications des colonies au cours de la réaction.

On procède de la façon suivante :

Une goutte de culture microbienne est placée entre lame et lamelle et portée sur la platine d'un microscope à contraste de phase. On repère, à l'aide du contraste, une colonie ou un fragment de colonie que l'on se propose d'étudier. On fait alors tomber une goutte de solution extemporanée de Rouge Neutre en milieu tamponné, au voisinage immédiat d'un bord de la lamelle de façon à ce que la goutte, en s'étalant, vienne mouiller ce bord. Ce liquide est alors aspiré sous la lamelle qui ne tarderait pas à flotter sur un bain de colorant si, contre le bord opposé de la lamelle, on ne disposait un petit rectangle de papier-filtre qui absorbe le liquide en excès. On règle le débit liquidien par adjonction de colorant, d'un côté de la lamelle, et du côté opposé par addition de papier-filtre sur le petit rectangle initial, procédé que l'on préfère au remplacement pur et simple du fragment initial parce qu'ainsi on éloigne les doigts du bord de la lamelle.

A l'examen on voit du reste, fort bien un « violent » courant liquidien parcourir la préparation, entraînant

avec lui des bacilles isolés, de menues colonies et parfois, d'autres bacilles isolés s'accrochant à la colonie examinée. Parfois aussi, hélas, lorsque le débit est mal réglé on voit une colonie suivie depuis longtemps déjà filer brusquement, entraînée par le courant liquide. Mais, avec un peu d'entraînement on contrôle beaucoup mieux la marche du colorant, qu'on ne pourrait s'y attendre à l'exposé d'une technique aussi sommaire. Il a été vérifié qu'en traitant les bacilles préalablement, par du Méthanol à 50 % les résultats n'étaient pas modifiés. L'emploi du Méthanol au cours du lavage dans la technique classique a surtout pour but de faciliter la centrifugation en diminuant la densité du liquide surnageant.

Cette technique présente les avantages suivants :

Il faut très peu de bacilles (moins que dans la technique classique) pour réaliser la réaction de DUBOS. On exerce un contrôle certain sur la nature des éléments colorés, contrôle qu'on ne peut réaliser dans la technique spectroscopique.

En effet, même sans coloration, en contraste de phase, les colonies de Mycobactéries ont une morphologie bien spéciale qui ne peut tromper l'observateur entraîné.

Par contre, on peut opposer à cette technique les défauts suivants : on limite l'examen à une colonie, deux ou trois au plus, donc à une population microbienne réduite, inconvénient qui n'existe pas dans la technique classique puisque la goutte examinée alors est considérablement enrichie en colonies par la centrifugation préalable, et, à plus forte raison, par la technique spectroscopique qui exige, comparativement, une énorme masse de bacilles.

La réaction de DUBOS peut donc être réalisée suivant des modalités différentes, qui toutes ont leur intérêt, selon l'étude qu'on se propose.

Nous verrons dans les chapitres suivants les résultats que ces techniques nous ont donnés et l'emploi que nous en avons fait.

CHAPITRE II

LA SPECIFICITE DE LA REACTION DE DUBOS ET SES VARIATIONS SUIVANT LES SOUCHES

SA FIXITE DANS LE TEMPS

Munis de la technique classique de DUBOS et de ses variantes nous sommes donc en mesure maintenant d'envisager l'importante question de la spécificité de la réaction de DUBOS.

En effet cette technique de coloration qui n'est en rien une technique de recherche des Mycobactéries nous a été donnée par DUBOS en vue d'établir la virulence des germes, des seules Mycobactéries du reste. Il convient donc d'établir le tableau général des souches étudiées par les différents auteurs et de voir si la réaction de DUBOS répond bien à la définition qu'en avait donnée ce dernier : « Réaction cytochimique de la virulence ». Pour commencer, nous ferons seulement état des statistiques des différents auteurs, que nous réunirons ensuite.

R. DUBOS et Y. MIDDLEBROOK (loc. cité) ont étudié 22 souches de bacilles tuberculeux et de Mycobactéries non pathogènes.

HAUDUROY et Y. POSTERNACK :

58 bacilles tuberculeux ;

67 mycobactéries non pathogènes ;

26 souches de microbes non acido-alcool-résistants.

F. INGRAO et C. VETERE [5] ont étudié :

- 42 bacilles tuberculeux ;
- 218 bacilles paratuberculeux.

Nous ne tiendrons pas compte des cas de S. de ANDRADE [6] qui a étudié la réaction de DUBOS dans un autre sens : la comparaison avec la fluorescence des bacilles.

Nous-même avons vu, à l'heure actuelle, avec J. VIALIER [7-8-9] :

311 bacilles tuberculeux :

- 304 bacilles tuberculeux humains récemment isolés de lésions tuberculeuses diverses ;
- 3 souches humaines de collection ;
- 4 souches bovines.

De plus :

- 6 souches aviaires ;
- 2 souches pisciaires ;
- 5 Mycobactéries non pathogènes ;
- 15 Germes pathogènes non acido-alcool-résistants ;
- 10 Germes non pathogènes,

la plupart déjà publiés.

Soit en tout parmi les cas publiés :

- 422 bacilles tuberculeux ;
- 309 mycobactéries non pathogènes ;
- 51 autres germes.

Dans les souches que nous venons de signaler, les bacilles pathogènes se coloraient en rouge d'intensité variable (HAUDUROY, VIALIER et TIGAUD, S. de ANDRADE, F. INGRAO et C. VETERE).

Les germes non pathogènes se coloraient en jaune. Des cas particuliers se sont présentés : HAUDUROY signale la teinte particulière prise par le B.C.G., un rouge un peu

violacé sur laquelle nous avons insisté avec J. VIAL-LIER [7]. Ce rouge assez difficile à définir (il s'agit d'un rouge carminé au lieu du rouge brique habituel) rend aisée, pour l'observateur très entraîné, l'identification du B.C.G.

Ce fait peut paraître surprenant car il nous fait ranger le B.C.G. parmi les germes pathogènes si l'on s'en tient strictement à la définition de DUBOS. HAUDUROY [2] a vérifié sur des bacilles B.C.G. de provenances différentes que cette teinte rouge se retrouvait dans tous les échantillons. Nous n'avons eu, nous-même, entre les mains que le B.C.G. de l'Institut Pasteur de Paris.

Ainsi, le B.C.G. se colore en rouge par le Rouge Neutre. Devons-nous rejeter en bloc la réaction de DUBOS ou dire simplement que pour le B.C.G. la réaction est faussée. D'autres observations permettent de nuancer l'opinion qu'on peut avoir sur cet important cas particulier.

En effet, HAUDUROY a signalé récemment que le Hamster doré (*Misocricetus auratus*) serait tuberculisé par le B.C.G., sans d'ailleurs que par passage il soit possible de faire récupérer au germe sa virulence initiale. Nous voyons ainsi se heurter ces deux modes d'investigation de la virulence : la méthode *in vitro* qui procède assez paradoxalement en dehors de toute constatation de tuberculose expérimentale et la méthode *in vivo*, variable dans ses résultats avec l'espèce animale réagissante.

On ne peut rejeter la méthode de DUBOS puisque, en somme, il existe pour HAUDUROY une espèce animale sensible au B.C.G. On peut seulement dire, et cela ne saurait surprendre en présence d'un test de virulence indépendant des tuberculoses expérimentales, que le Rouge Neutre révèle une aptitude pathogène latente sans préjuger de l'espèce animale pour laquelle sera révélée cette virulence.

Si nous poussons à l'extrême ce raisonnement, nous en arrivons à discuter alors l'observation de L. RICHMONT et M. M. CUMMINGS [10] : ces auteurs ont isolé du radis une *Mycobactérie* non pathogène qui se colorait en rouge

par le Rouge Neutre. On pourrait alors admettre que le Rouge Neutre a dans ce cas révélé l'aptitude pathogène de cette Mycobactérie « pour le radis ».

Par contre, on ne saurait discuter l'observation de J. DESBORDES et F. FOURNIER (loc. cité) qui ont observé pour une Mycobactérie F₃ réputée non pathogène une coloration en Rouge : 5 souches de F. INGRAO et C. VETERE (loc. cité) dépourvues de réaction de DUBOS ont tuberculisé le cobaye. Nous les étudierons plus loin avec la Virulence-Cobaye.

Nous ne discuterons pas, non plus, les observations d'HAUDUROY [2] : quatre souches de bacilles acido-alcoolorésistants isolées à partir de larves de « *Pulex irritans* », nourries avec une émulsion de lépromes se colorent en Rouge.

Dans ce cas, les rapports de ces bacilles avec le bacille de HAUSEN nous paraissent trop difficiles à établir, les renseignements que nous avons, concernant ces souches, étant trop succincts pour que l'on puisse valablement discuter leur coloration par le Rouge Neutre. Par contre, nous avons pu observer que le bacille de STEFANSKY se colorait en rouge par le Rouge Neutre, ce qui nous montre, de plus, que la réaction de DUBOS est spécifique d'une forme de virulence et non d'un type lésionnel anatomique ou clinique.

En résumé sur ces 782 souches étudiées, avec toute la gamme des résultats positifs et négatifs, un seul bacille : celui de J. DESBORDES et FOURNIER (loc. cité) donne une coloration en contradiction formelle avec l'affirmation de DUBOS « Réaction cytochimique de la virulence ».

Au cours de ces expériences destinées dans l'esprit des auteurs que nous venons de citer, à vérifier la spécificité de la réaction de DUBOS, on a pu très rapidement se rendre compte que parmi les bacilles effectivement pathogènes et, bien entendu, colorés en rouge par le Rouge Neutre, on pouvait distinguer des différences très nettes dans l'intensité de la coloration.

Nous avons voulu préciser les limites extrêmes de ces colorations par l'examen spectroscopique tel que nous l'avons décrit. L'examen a toujours été effectué plus de quarante jours après l'ensemencement afin d'éviter la cause d'erreur due à l'examen des bacilles immatures, n'ayant pas encore réalisé leurs synthèses lipidiques.

Dans nos conditions expérimentales, rappelons-le, on observe une bande d'absorption continue à partir du vert jusqu'au violet. Cette bande intéresse toujours le violet et s'étend plus ou moins loin en direction du vert, qui est intéressé en plus ou moins grande partie.

C'est la limite du spectre du côté du vert que nous avons noté sur le schéma suivant (fig. 1) en étudiant cinq fois le bacille sous les cinq épaisseurs que nous avons signalées, de 5 à 1 dixième de millimètre.

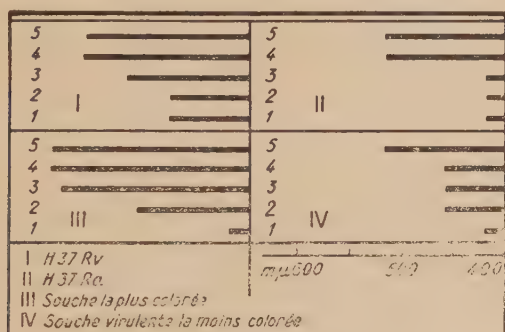


FIG. I

La sécrétion de pigment par certaines souches peut gêner l'interprétation des chiffres trouvés à l'examen spectroscopique. Aussi, avons-nous, pour ces derniers, procédé à la mesure préalable de l'absorption donnée par les bacilles à l'état vivant, non colorés par le Rouge Neutre, puis à la mesure de l'absorption donnée par les mêmes bacilles colorés.

Trente-sept souches de Mycobactérium Tuberculosis, var. Hominis, récemment isolées d'expectoration ou de

pus de malades atteints de tuberculose pulmonaire ou pleurale, souches que nous considérons comme virulentes, se sont colorées sous l'influence du Rouge Neutre.

Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, ce qui nous a paru le plus caractéristique, c'est l'absorption sous l'épaisseur de 3/10 de mm. : tous ces bacilles absorbaient à plus de 450 m μ et la plupart au-dessus de 500 m μ . La persistance d'une absorption notable dans le vert sous l'épaisseur de 2/10 ou parfois même de 1/10 de mm. est aussi très significative.

A titre d'exemple, nous indiquons les limites d'absorption sous les différentes épaisseurs, pour les souches H 37 Rv. et deux souches humaines, la plus et la moins colorée.

Souches	Absorption en m μ sous une épaisseur de :				
	5 1/10 mm.	4 1/10 mm.	3/10 mm.	2/10 mm.	1/10 mm.
H 37 Rv.	580 m μ	580 m μ	520 m μ	480 m μ	480 m μ
G.A.I.	590	590	580	510	420
S.A.U.	520	460	460	460	420

Une souche bovine (Rav.) absorbait fortement à 520 m μ sous 3/10 de millimètre d'épaisseur et à 470 m μ sous 2/10 de millimètre. Quatre bacilles aviaires absorbaient peu à 450 m μ sous 3/10 de millimètre d'épaisseur.

Une souche humaine avirulente (H 37 Ra) nous a donné des résultats tout différents. L'absorption était importante sous les épaisseurs de 5 et 4/10 de millimètre (520, 520 m μ) mais diminuait rapidement pour les épaisseurs suivantes (3, 2, 1 dixième de millimètre, 420 m μ , 420 m μ , 420 m μ).

Il en fut de même pour deux souches homogènes (humaine et bovine) entretenues en eau peptonée glycinée et ne donnant pas chez le cobaye de tuberculose expérimentale.

Le B.C.G. donne un spectre d'absorption de pouvoir tinctorial moyen sans qu'on puisse définir de façon pré-

cise la teinte particulière signalée par HAUDUROY et POSTERNACK, GALLIA et nous-même.

A titre de comparaison, 14 bactéries d'autres groupes ont été examinées : 6 souches de staphylocoques, *Proteus* 0 X 19, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli* et groupes voisins (4 souches) *Bacillus subtilis*, *Bacillus lactis* souche *Westermanii* (cultures pigmentées ou non). Sous l'épaisseur maxima de 5/10 mm. l'absorption est variable, mais sous l'épaisseur de 3/10 mm., ces bactéries absorbent au-dessous de 470 m μ . Ce qui nous a paru caractéristique, ce n'est pas, naturellement, l'absorption sous forte épaisseur qui peut s'étendre fort loin, mais la rapidité avec laquelle le spectre s'efface lorsqu'on diminue l'épaisseur.

Nous avons enfin étudié trois bacilles paratuberculeux pigmentés l'un en jaune, les deux autres en rouge. En milieu de Youmans, sérum de cheval, le pigment est peu abondant, mais sur milieu solide, il gêne considérablement les mesures. Les absorptions sous forte épaisseur sont alors tout à fait voisines de celles des bacilles fortement virulents.

Nous avons pensé qu'il était possible de mesurer cette absorption avant et après coloration par le Rouge Neutre. Non colorés, les bacilles dépourvus de pigmentation, tuberculeux ou autres, n'absorbent pas au-dessus de 430 m μ sous 3/10 mm. d'épaisseur. Les bacilles pigmentés (généralement en rouge, jaune ou brun) frappent par une absorption, variable avec les souches étudiées mais toujours supérieure à 430 m μ , sous cette épaisseur.

Nous avons pour les trois souches étudiées mesuré l'absorption avant et après coloration par le Rouge Neutre. Nous n'avons pas, pour ces souches, trouvé de différence notable dans l'absorption avant et après coloration.

Après avoir exposé les résultats des travaux dont nous avons pu avoir connaissance et les résultats de nos propres recherches, nous croyons pouvoir résumer ainsi l'état de nos connaissances sur la valeur de la réaction de DUBOS : sa spécificité est très grande.

Il existe pourtant des souches pour lesquelles la réaction de DUBOS n'est pas absolument conforme à ce qu'on pourrait prévoir. En général, il s'agit alors de souches assez particulières dont la réaction de DUBOS anormale n'est pas la singularité majeure.

Enfin, même dans les cas de métachromasies en Rouge du Rouge Neutre, nous croyons avoir objectivé par l'examen spectroscopique ces grandes variations dans l'intensité des colorations qu'HAUDUROY et nous-même avions déjà signalé. Nous avons tenté d'éliminer par ce mode de lecture particulier, le plus possible, les facteurs d'interprétation personnelle.

On peut penser que des souches de Mycobactéries pathogènes régulièrement entretenues au Laboratoire, en particulier certaines souches de collection dont la virulence se conserve bien et qui servent souvent d'étalons, devaient donner des réactions de DUBOS égales à elles-mêmes au cours de repiquages successifs. Il s'agit là d'une question d'importance pour plusieurs raisons : il faut savoir si l'intensité de la réaction de DUBOS d'une souche donnée est un caractère assez constant pour que les différences d'affinité tinctoriales des différentes souches que nous venons de signaler méritent d'être retenues.

De plus, on aurait là un procédé de contrôle des souches de collection d'un certain intérêt pour l'étude de la pérennité des souches.

C'est pourquoi nous avons répété souvent ces mesures sur certaines souches de collection et sur des souches de l'Institut Bactériologique de Lyon régulièrement entretenues et contrôlées au Laboratoire de la Tuberculose par le Docteur VIALIER en vue de contrôler la régularité des résultats obtenus à des intervalles éloignés : nos techniques de coloration ont été chaque fois fidèlement reproduites, la durée de la culture et le milieu (sauf lorsque nous le précisons) ne varient pas.

Nous indiquons chaque fois, non l'écart extrême des mesures entre la première et la dernière mais l'écart

maximum observé entre deux mesures, quelle qu'en ait été la date précise.

Dans ces conditions nos résultats ont été les suivants :

TABLEAU I

SOUCHE	NOMBRE DES MESURES	INTERVALLE COMPRIS ENTRE LA PREMIÈRE ET LA DERNIÈRE MESURE	ÉCART EXTRÊME DES MESURES FAITES SOUS 3/10 MM. ÉPAISSEUR
H 37 Rv (m. de Youmans)	17	22 mois	5 mμ
H 37 Rv (Loewenstein)	7	21 mois	5 mμ
H 37 Ra	5	22 mois	5 mμ
M. phlei	7	18 mois	10 mμ
L.P.	9	17 mois	10 mμ
B.C.G.	5	22 mois	5 mμ
Gaid	12	20 mois	5 mμ
Per.	10	20 mois	5 mμ
Thom.	10	20 mois	10 mμ

Nous voyons ainsi que l'écart maximum observé entre deux mesures, même avec une expérimentation déjà très étalée dans le temps, ne dépasse pas 10 mμ avec notre technique.

Les conclusions générales de ce chapitre seront donc les suivantes :

— En dehors de rares cas pouvant prêter à discussion, la Réaction de DUBOS mérite bien d'être appelée : Réaction cytochimique de la virulence.

— L'affinité tinctoriale des Mycobactéries pour le Rouge Neutre diffère notablement d'une souche à l'autre.

— Cette affinité tinctoriale est un caractère remarquablement fixe pour une souche donnée. Elle la définit au même titre que d'autres caractères morphologiques ou cultureux peuvent le faire et pourrait compter parmi ces derniers.

CHAPITRE III

COLORATION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PAR LE ROUGE NEUTRE ET VIRULENCE DU BACILLE POUR LE COBAYE

Nous venons d'établir dans les chapitres précédents ce qu'on pouvait penser de la spécificité de la réaction de DUBOS et des variations de cette réaction en présence de souches pathogènes différentes. Nous avons vu les réserves qu'il convenait de faire et nous avons conclu que la réaction de DUBOS était en somme très spécifique des Mycobactéries, et parmi ces dernières, spécifique des germes pathogènes. Nous avons noté également combien peut varier selon les souches de ces germes la réaction de DUBOS. Le problème qui se présente alors est le suivant : ces différences d'affinité tinctoriales pour le Rouge Neutre dans les conditions de la Réaction, pour un même genre, une même espèce, une même variété, *Mycobactérium Tuberculosis* var. *Hominis*, sont-elles significatives ?

C'est DUBOS lui-même qui a appelé sa réaction « Réaction cytochimique de la virulence ». Mais nous ne savons pas encore quel est le degré de sensibilité de la méthode.

En effet, si la réaction de DUBOS nous permet la seule discrimination entre Paratuberculeux saprophytes et germes pathogènes, elle mérite le nom de « Réaction cytochimique de la virulence ». Mais peut-on aller plus loin et considérer deux souches — nous disons bien deux souches — du même germe comme de virulence différente, avec pour seul argument une réaction de DUBOS d'intensité différente ?

Cette question nous a paru très difficile à aborder pour deux raisons.

D'abord parce que parmi les trois facteurs de la virulence deux d'entre eux, la communicabilité et l'invasibilité sont difficiles à atteindre et à mesurer pour les Mycobactéries.

Ensuite, parce que l'estimation du pouvoir pathogène par inoculation nous paraissait tout aussi difficile à aborder pour obtenir une comparaison valable avec la réaction de DUBOS. En effet il est évident que la réaction de DUBOS, réaction *in vitro*, est indépendante entièrement des variations d'espèces auxquelles les expériences *in vivo* sont soumises.

Pour préciser notre pensée, rappelons quelques faits notoires : Mycobacterium Tuberculosis var. Hominis et Mycobacterium Tuberculosis var. Bovis ont un pouvoir pathogène différent pour le lapin.

Si nous testons la virulence des Mycobactéries sur Misocricetus auratus (Hamster doré) nous y gagnons de considérer le B.C.G. comme un germe virulent selon HAUDUROY.

Et que dire des bacilles aviaires et pisciaires ?

Ces raisons nous ont déterminé à pratiquer l'expérimentation le plus simplement possible, en inoculant nos souches au cobaye, parce qu'on peut considérer la virulence-cobaye comme une technique de référence pour la mesure de la virulence des Mycobactéries. En effet la virulence-cobaye a suscité de nombreux travaux quant à la mesure de la virulence elle-même, dont l'étude de A. BERGERON et Mlle MEZIÈRES [11-12], de telle sorte que les techniques sont actuellement bien codifiées, surtout depuis le rapport de A. BOQUET [13]. En outre, de très nombreux auteurs ont basé leur expérimentation sur ce mode d'expression de la virulence, rendant ainsi, fait remarquable en Biologie croyons-nous, les résultats parfaitement comparables et communicables d'un auteur à l'autre.

Si nous laissons de côté les techniques originales de

ROLOFF et PAGEL, puis de Bruno LANGE, mesurant la virulence par comparaison entre différentes souches par inoculation aux quatre membres, nous disposons pour apprécier la virulence des Mycobactéries sur le cobaye de deux grandes méthodes :

1° Inoculation d'une quantité fixe de bacilles. Sacrifice des animaux au bout d'un temps fixe. On apprécie la virulence selon l'importance des lésions trouvées à l'autopsie.

2° Inoculation d'une quantité fixe de bacilles. Mesure de la durée de survie. Pour obtenir, suivant cette technique, des résultats intéressants, il convient de pouvoir disposer d'un grand élevage, mais assez rare, à l'entretien coûteux, restant malheureusement exposé à des épizooties dévastatrices malgré une surveillance soigneuse, qui, seul, peut donner des animaux très comparables entre eux, c'est-à-dire des animaux provenant de géniteurs comparables, nourris de la même façon, élevés dans des locaux de salubrité rigoureusement identique. A. BERGERON et Mme LAVAGNE-MEZIÈRES sont revenus encore récemment sur ce point (loc. cité).

Il n'en reste pas moins indispensable d'avoir recours à l'inoculation simultanée de plusieurs animaux pour chaque souche afin d'écarter autant qu'on peut, le facteur inévitable et imprévisible de résistance ou de fragilité individuelle de chaque individu à l'infection tuberculeuse.

Pourtant de tels animaux, fragilisés par l'infection tuberculeuse sont susceptibles de mourir d'une infection intercurrente, d'autant plus que la longue durée de l'expérience favorise cette éventualité qui vient fausser la mesure de la durée de survie.

C'est pour cela que nous avons combiné en quelque sorte les deux méthodes en mesurant la durée de survie mais aussi en pratiquant chaque fois l'autopsie des animaux.

Nous n'avons retenu que les animaux morts de lésions généralisées et importantes de tuberculose expérimentale pouvant à elle seule expliquer la mort.

Nous avons donc établi notre expérimentation sur les bases suivantes (J. VIALIER et J. TIGAUD) [8].

Les cobayes sont inoculés par voie sous-cutanée dans la région inguinale, à la dose de 1/10 de milligramme de poids frais de bacilles par kilogramme d'animal. Ces bacilles, cultivés sur milieu de LÆWENSTEIN étaient pesés entre le 25^e et le 30^e jour de culture et émulsionnés dans de l'eau physiologique.

Nous insistons sur la nécessité de prendre des bacilles d'âge comparable, sans quoi la Réaction de DUBOS perdrait de sa valeur. Nous reviendrons longuement sur ces faits.

Pour chaque souche, trois animaux étaient inoculés de façon semblable afin d'écarter le facteur individuel de résistance. Suivant la durée de survie, nous classons nos souches en souches à virulence faible, moyenne et importante.

Sur une partie du liquide de dilution qui va servir à l'inoculation des animaux, nous pratiquons une réaction de DUBOS classique et nous classons l'intensité de la coloration en faible, moyenne, importante.

Il n'est pas inutile de préciser à quelle sorte de souche nous nous sommes adressé. En dehors de quelques souches de collection qui nous ont servies de référence, toutes nos souches ont été isolées récemment de produits pathologiques humains.

L'inoculation au lapin, concomitante, nous a montré que dans tous les cas que nous rapportons, il s'agissait de bacilles tuberculeux de type humain.

Le tableau de concordance que nous présentons ci-dessous est le résultat du double test de virulence. - Cobaye, virulence cytochimique de 25 souches étudiées ainsi :

<i>Virulence cobaye</i>		<i>Intensité de coloration</i>			
		Faible	Moyenne	Importante	
Importante	6 souches	0	2	4	
Moyenne	12 souches	3	7	2	
Faible	7 souches	2	5	0	

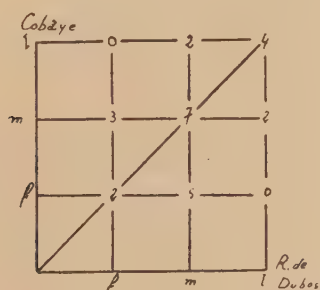
A la lecture de ce tableau, on peut voir qu'il n'y a pas eu de relation directe, ni un parallélisme absolu entre la virulence pour le cobaye et l'intensité de la coloration par le Rouge Neutre. Cependant, toutes nos souches fortement colorées furent douées, pour le cobaye, d'une virulence importante ou moyenne. Aucune souche fortement colorée ne se montra peu virulente pour le cobaye.

On croit saisir avec la coloration par le Rouge Neutre un test de virulence absolue. Mais à l'heure actuelle, il nous paraît prématuré d'attribuer une plus grande valeur à l'un de ces tests, dont nous connaissons la relativité, plutôt qu'à l'heure dont nous ne connaissons pas encore avec certitude le mécanisme intime.

Il nous paraît plus sage de supposer que le Rouge Neutre nous renseigne sur un facteur de la virulence seulement, sans préjuger de l'existence d'autres facteurs que nous ignorons encore.

Nous ne croyons pouvoir aller plus loin dans nos conclusions parce que ces expériences sont restés encore trop peu nombreuses, mais nous avons essayé sur ce petit nombre d'essais d'établir une carte des écarts.

FIG. II

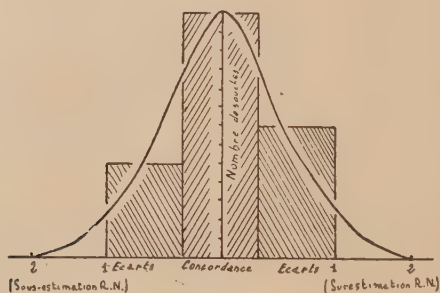


— Sur la ligne bissectrice se trouvent indiqués les résultats du tableau précédent, parfaitement concordants.

— Au-dessus, les résultats, tels que la réaction de DUBOS sous-estime la virulence-cobaye:

— Au-dessous, les résultats, tels que la réaction de DUBOS surestime la virulence-cobaye.

On peut alors ébaucher une courbe de répartition des écarts.



Le trop petit nombre de mesures ne nous permet pas d'affirmer la réalité expérimentale d'une telle courbe, mais permet croyons-nous de suggérer que les écarts entre la virulence-cobaye et la virulence cytochimique obéissent probablement à la loi de répartition des écarts de GAUSS-LAPLACE, c'est-à-dire ne sont pas attribuables à une erreur systématique de l'un ou l'autre système de mesure, mais au « hasard », c'est-à-dire à la somme des erreurs « possibles », tant avec l'un des systèmes de mesure qu'avec l'autre.

Nous croyons pourtant devoir discuter ici deux séries de faits. Nous avons retenu des expériences de F. INGRAO et VETERE (loc. cité) deux souches de bacilles isolées l'une d'un morceau de bois vermoulu, l'autre d'une mouche domestique, toutes deux à Réaction de DUBOS peu marquée, non virulentes pour le cobaye, et cinq souches de Mycobactéries isolées de mouches domestiques à Réaction de DUBOS nulle qui se sont montrées virulentes pour le cobaye, sur 136 souches de Mycobactéries saprophytes étudiées par ces auteurs. Ceux-ci ne précisent pas si la

souche a été réisolée après passage sur le cobaye et quelle était alors la Réaction de DUBOS. Nous avons réalisé une expérience que nous voudrions rapprocher de ces faits :

Une de nos souches (Souche Sau...) provenait des crachats d'un malade atteint d'une tuberculose pulmonaire.

Cette souche présentait une réaction de DUBOS très nette. Après plusieurs passages sur eau peptonée glycerinée, nous avons vu la réaction de DUBOS s'atténuer et disparaître. Après une dizaine de passages, convaincus par de nouvelles réactions de DUBOS de l'« avirulence cytochimique » de cette souche, nous l'avons inoculée au cobaye, ce dernier a présenté une tuberculose à marche lente il est vrai, mais il s'est tuberculisé. Or nous avons pu à partir du cobaye isoler à nouveau cette souche. Elle présentait une réaction de DUBOS positive ! Ce qui nous montre simplement que dans certaines conditions d'habitat, les souches de Mycobactéries peuvent perdre passagèrement leur réaction de DUBOS. On peut se demander et c'est là une simple hypothèse, s'il n'en a pas été ainsi pour les bacilles de F. INGRAO et C. VETERE dont la Réaction de DUBOS se serait spontanément et passagèrement atténuée.

Pour terminer cette étude des rapports de la virulence cytochimique et de la virulence-cobaye nous dirons que la confrontation des résultats des deux méthodes pose au chercheur dans des cas peu nombreux, il est vrai, des problèmes difficiles à trancher, cas rares, qui n'empêchent pas sinon la concordance, du moins l'analogie des deux séries de faits.

CHAPITRE IV

COMPARAISON ENTRE LA MARCHÉ DE LA COLORATION PAR LE ROUGE NEUTRE AVEC LA COLORATION DES MYCOBACTERIES PAR D'AUTRES COLORANTS

Avant de poursuivre l'étude de la réaction de DUBOS, nous voudrions insister un peu sur la marche de la coloration des Mycobactéries par le Rouge Neutre dans les conditions de cette réaction et présenter le comportement des mêmes Mycobactéries en présence de deux colorants classiques en Bactériologie, ainsi que le développement d'une coloration de ZIEHL, telle qu'on peut l'observer à l'aide de la Fuschine tension active (J. DESBORDES) [14].

Pour suivre la marche de ces colorations, nous nous sommes adressé à la variante de la réaction de DUBOS que nous avons précédemment décrite : la réaction de DUBOS sur colonie repérée.

La préparation mise en place sur la platine du microscope à contraste de phase, le colorant ajouté, on voit de menus débris, des bacilles isolés qui passent rapidement dans le champ du microscope indiquant le déplacement d'un rapide courant liquide, mais avec un peu de chance, en surveillant le débit du liquide, la colonie ne se déplace pas. Nous allons bientôt en tirer argument. Puis, 2 à 3 minutes après le début de l'opération, la coloration apparaît ; elle va s'intensifier, touchant des éléments de plus en plus nombreux pendant 5 à 10 minutes. Dix à quinze minutes après le début de l'introduction du colorant l'état reste inchangé. Trois heures après la coloration n'est pas

modifiée. Il ne s'agit pas d'une coloration en masse, mais certains éléments sont colorés préférentiellement.

Dans le temps : les premiers éléments colorés sont des éléments centraux, par rapport à la colonie, périphériques par rapport aux axes sombres que nous avons décrits. Ils fragmentent la colonie en traits rouges, irréguliers, ramifiés, rappelant des tracés de cartes géographiques, la teinte rouge diffuse très lentement vers les axes sombres, sans les atteindre. La colonie devient progressivement plus foncée par fines ramifications successives des quelques grands tracés initiaux, les ramifications sont fréquentes au centre de la colonie, rares vers la périphérie ou les prolongements de la colonie. Les axes sombres ne paraissent pas intéressés par le Rouge Neutre. L'effet de contraste s'atténue quand la coloration s'accroît. Enfin, l'examen avec un écran vert accuse ces différences tinctoriales.

Sur les colonies minces et allongées, les extrémités ne sont pas colorées, pas plus que les prolongements des grosses colonies manifestement formées d'éléments bacillaires jeunes.

On pourrait admettre que cette coloration n'est visible que lorsqu'on a affaire à un nombre important de bacilles empilés, comme ce pourrait être le cas avec de grosses colonies, mais l'examen de longs filaments mycéliens montre qu'en réalité, c'est bien la seule extrémité libre de ces filaments qui reste non colorée, extrémité pouvant atteindre parfois, suivant l'âge de la colonie, quatre à six diamètres de champ oculaire. Au contraire, la partie médiane de ces colonies allongées, ou la partie proximale des longs prolongements mycéliens prend la coloration. Notons, de plus, que dans ces conditions expérimentales la colonie ne peut rester dans le champ du microscope, sans être entraînée par le courant liquide, qu'à la condition d'être pincée entre lame et lamelle. Nous vîmes trop de colonies fuir brusquement, pour ne pas en être persuadé.

Par conséquent, il paraît logique de penser que le colorant n'imprégnant bien que le bord des colonies, ce dernier devrait se colorer en premier si tous les éléments bacillaires avaient une aptitude tinctoriale identique. Or, ce sont justement ces éléments centraux qui se colorent en premier. Nous pensons que ce fait s'explique par la moins grande affinité tinctoriale des bacilles jeunes, hypothèse en faveur de laquelle d'autres arguments vont plaider.

Notons que cette expérience n'est possible qu'avec des bacilles prenant le Rouge Neutre, c'est-à-dire se colorant en Rouge par métachromasie en présence de colorant jaune.

On ne peut savoir s'il s'agit d'une coloration initialement jaune des bacilles, suivie d'une métachromasie ; ou d'une teinture en rouge des bacilles, avec métachromasie d'emblée. Il est simplement permis de dire que s'il s'agit d'un virage après coloration, ce virage est certainement très rapide.

Notre curiosité ayant été éveillée par l'étude cinétique de cette réaction, disons plutôt, pour ne prêter à aucune confusion, par l'étude de la progression de la coloration sur certains éléments seulement des colonies, nous avons voulu voir comment dans des conditions semblables, se comportaient d'autres colorants usuels en Bactériologie.

Nous avons d'abord étudié le Bleu de Méthylène et le Violet de Gentiane, colorants simples, et le développement complet de la coloration de ZIEHL.

Voyons d'abord le cas du Bleu de Méthylène et du Violet de Gentiane. Tous deux se comportent de façon identique.

Une première remarque s'impose : à la concentration de 1 % habituellement utilisée, la coloration est trop rapide pour pouvoir être suivie ainsi entre lame et lamelle et nous diluons les colorants standard du Laboratoire au 1/10 avec de l'eau distillée, la concentration est alors voisine de celle du Rouge Neutre dans la réaction de DUBOS.

A cette concentration le Bleu de Méthylène et le Violet de Gentiane se comportent de la même façon et colorent les colonies en deux phases. Tout d'abord, sont atteints par le colorant, les éléments marginaux des colonies. Puis progressivement, la coloration s'étend de façon centripète, atteignant plus tard le centre des colonies. Alors, commence une seconde phase durant laquelle les éléments centraux des colonies, en raison sans doute de leur épaisseur, acquièrent une teinte plus foncée que les éléments marginaux. Mais nous tenons à souligner qu'en employant ces colorants, les bacilles initialement teintés sont bien, comme on peut s'y attendre les éléments périphériques.

Pour pratiquer, entre lame et lamelle une coloration de ZIEHL, nous nous sommes adressé à cette modification récente de la coloration qui a été proposée par PARAF, DESBORDES et GUYOTJEANNIN [15]. Nous voulons dire par là, l'emploi des fuschines tensio-actives, qui dispensent du chauffage des préparations.

Les réactifs utilisés ont été :

1° *De la fuschine diluée.*

Fuschine banque de ZIEHL phénique classique, additionnée d'une goutte par 10 cc. de « Twen 80 » en guise de mouillant. Filtrer extemporanément. Pour les raisons précédemment exposées, nous faisons de ce colorant une dilution au 1/10, avec de l'eau distillée.

2° *Acide nitrique* à 1/30 (dilution au 1/10 de la solution habituellement utilisée).

Nous étudierons successivement l'imprégnation par le ZIEHL, la décoloration, le lavage à l'eau distillée.

L'imprégnation par le ZIEHL dure de 5 à 10 minutes. Les premiers éléments atteints ne sont pas les éléments les plus périphériques des colonies. Toutefois, beaucoup plus d'éléments sont touchés que par le Rouge Neutre au cours de la réaction de DUBOS. Mais on doit noter que

certaines éléments très périphériques ne sont pas imprégnés par le colorant.

Après dix minutes, même en prolongeant le passage du colorant, l'aspect reste inchangé. La colonie apparaît violemment colorée par la fuschine, en rouge vif, sauf — nous insistons encore sur ce point — quelques rares éléments marginaux.

On passe alors à la seconde phase de la coloration de ZIEHL, la décoloration à l'acide nitrique. Cette dernière est très rapide et se produit entre 20 et 30 secondes. Tous les éléments colorés s'effacent laissant à la colonie une teinte jaunâtre ne disparaissant pas même après passage prolongé du décolorant. Il s'agit de la même teinte jaunâtre que celle obtenue dans la coloration de ZIEHL classique lorsqu'on sort les lames du bain d'acide azotique.

On procède alors au lavage de la préparation avec de l'eau distillée. En 30 secondes, on voit alors réapparaître la fuschine, d'une teinte un peu plus violacée du reste, qu'au stade initial de la coloration. On s'aperçoit alors que certains éléments bacillaires qui, antérieurement étaient colorés par la fuschine n'ont pu résister au stade de décoloration et, pour un observateur non prévenu, on obtient une colonie dont l'aspect est exactement superposable aux figures de coloration obtenue par la réaction de DUBOS.

Nous ne croyons pas, du reste, que ces résultats puissent beaucoup surprendre : ces figures de coloration par le ZIEHL ont déjà été obtenues par de nombreux auteurs dont BESANÇON et PHILIBERT, dans leurs travaux sur la coloration de ZIEHL appliquée à des coupes de voiles, dont également ARLOING et MALARTRE. Leurs travaux ont été confirmés par de nombreux auteurs. Récemment enfin, P. HAUDUROY reprend la question sur des cultures en voile et confirme encore les résultats déjà anciens de ces auteurs. On trouvera du reste une abondante bibliographie de cette question dans l'ouvrage d'HAUDUROY : « Bacilles Tuberculeux et Paratuberculeux » (MASSON, 1950).

En résumé, nos expériences sur la coloration des Mycobactéries par la fuschine tensio-active, confirment entièrement les données classiques sur le cycle de l'acido-alcool-résistance des bacilles tuberculeux.

L'affinité tinctoriale pour le Rouge Neutre présente dans son apparence morphologique les mêmes variations que l'acido-alcool-résistance, tout au moins pour les Mycobactéries susceptibles de virer au Rouge par le Rouge Neutre.

CHAPITRE V

VARIATIONS DE LA REACTION DE DUBOS

Il ne faut pas se dissimuler que la réaction de DUBOS est sujette à des variations. Nous venons de décrire du reste dans le chapitre précédent, avec la morphologie des colonies colorées au Rouge Neutre, des aspects différents de bacilles marginaux et centraux des colonies. Or, il ne saurait faire de doute dans ce cas, qu'il s'agit bien de bacilles de même souche. Dès 1950, nous avons, avec J. VIALIER [5] attribué ces variations de la coloration des bacilles à l'âge différent des bacilles d'une même colonie. Nous avons aussi commencé l'étude des bacilles tués. A cette époque, nous ne disposions pas encore de la variante spectroscopique de la réaction de DUBOS que nous avons proposée : et depuis, nous avons revu nos résultats avec cette technique. Enfin, la nécessité d'opérer sur des bacilles de culture, nous a obligé à préciser le retentissement que peuvent avoir les conditions de culture sur la Réaction de DUBOS. Nous envisageons donc dans ce chapitre :

- Les bacilles tués.
- Les milieux pauvres.
- L'effet des divers agents thérapeutiques.
- Les variations suivant l'âge.

A) LES BACILLES TUÉS.

Nos tous premiers essais concernant les bacilles morts furent pratiquement dus au hasard. En 1950, nous man-

quâmes un jour de souches fraîches pour effectuer des réactions de DUBOS. Nous découvrîmes alors une souche de bacille humain pathogène cultivé sur pomme de terre glycerinée et qui n'avait pas été réensemencée depuis trois ans. Le fragment de pomme de terre, et les bacilles qu'il supportait avait acquis une dureté ligneuse. Nous l'avons pourtant broyé et émulsionné de notre mieux. Nous l'avons repiqué et examiné après coloration au Rouge Neutre. Ces bacilles se comportèrent, selon la technique de DUBOS, comme des bacilles virulents, mais les repiquages n'ont pas permis d'obtenir de nouvelles cultures. Il s'agissait donc de bacilles humains virulents, mais morts. Neuf souches de bacilles humains ont alors été tuées par passage d'une demi-heure à l'autoclave à 120°. Les réactions tinctoriales ont été les mêmes que celles des témoins entretenus en milieu de YOUNG. Le fait, nous l'avouons, ne nous a pas paru extrêmement surprenant : nous avons alors connaissance des recherches d'ASSELINÉAU et LEDERER [16] qui attribuaient la réaction de DUBOS à l'acide mycolique libre des cires et à un lipopolysaccharide azoté et phosphoré à haut point de fusion ; et il ne nous avait pas paru très surprenant de voir des bacilles morts, donc devenus avirulents, conservés sous forme de leur acide mycolique et du lipopolysaccharide cité plus haut, le « souvenir » de la virulence qu'ils avaient à l'état frais, et bien entendu, la réaction de DUBOS qui leur était conférée par les corps cités par ASSELINÉAU et LEDERER.

Nous avons pourtant noté ce fait, en lui donnant cette explication car nous avons déjà en vue la comparaison de la virulence de la cytochimique et de la virulence animale, cette dernière exigeant, pour se manifester des bacilles vivants, donc une virulence actuelle.

Mais nous devons reconnaître que cette façon de voir ne fut pas partagée par tous les auteurs. Et J. DESBORDES et E. FOURNIER [17] attribuant la Réaction de DUBOS à un potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire, différent

suivant les souches utilisées et dépendant de l' « équipement enzymatique initial » se montrèrent « surpris » de ces résultats. Nous en discuterons lorsque nous envisagerons le mécanisme de la réaction. Nous avons alors repris cette étude et, pour le moment, nous nous bornerons à noter les résultats de l'examen spectroscopique de bacilles tués suivant divers procédés.

Nous n'indiquons dans le tableau suivant que les variations de la mesure des spectres en $m\mu$, en plus ou moins, des essais par rapport aux témoins.

Nos mesures étaient effectuées sous 3/10 mm. d'épaisseur de bacilles.

Souches :

	L.P.	FLÉ- OLE	H 37 RA	H 37 RV	GAL.	PER.	AVIAI- RE
Autoclave	0	0	0	+5	+5	+20	+5
1 H. 120°							
Ultra-violet	0	0	0	0	0	0	0
18° C. { éther	0	0	0	0	0	0	0
de contact { alcool 95°...	+5	+5	+5	+5	+10	+10	+5
5 jours { formol 40 %	0	0	0	0	+5	0	0

L'étude de ce tableau nous montre en somme, de très faibles variations de l'affinité tinctoriale pour le Rouge Neutre des différents bacilles étudiés.

Nous avons partagé nos bacilles en deux lots chaque fois pour chaque agent léthal en répartissant dans deux tubes à centrifuger la moitié du contenu d'une culture en milieu de YOUNG des Mycobactéries étudiées. Le culot de centrifugation était donc sensiblement égal dans chaque tube. L'un d'eux était conservé à la glacière comme témoin, l'autre traité comme nous l'avons indiqué. Or, nous avons remarqué que le chauffage, l'alcool et le formol, ce dernier surtout, rétractaient nos bacilles.

On peut donc se demander si les variations observées étaient réellement dues à une fixation plus grande de colorant pour chaque bacille ou simplement à la contraction sous un plus faible volume, donc sous une densité optique plus forte, de la matière colorée.

Cet avis est renforcé par le fait que les bacilles avirulents aussi présentent des variations d'absorption dans le même sens.

Notons en outre que, dans le cas du formol, ce dernier a pu neutraliser certains groupements aminés, renforçant ainsi les groupements acides libres et dévier vers le Rouge la coloration.

Il est en tout cas remarquable qu'une « mort physique » par l'Ultra-Violet, n'ait en rien changé la teinte des bacilles dont le volume est resté égal à celui des témoins à froid. Enfin, l'éther à froid n'a pas paru enlever la moindre substance chromogène.

De l'ensemble de ces constatations nous concluons :

— que la mort des bacilles modifie très peu la réaction de DUBOS, dont les variations peuvent, en partie du moins être attribuées à une contraction des bacilles par un agent fixateur.

B) LES MILIEUX PAUVRES.

La nécessité où nous nous trouvons à l'heure actuelle de pratiquer la réaction de DUBOS sur des bacilles de culture, nous oblige à envisager l'influence sur la réaction de DUBOS des passages sur divers milieux de culture.

Nous avons déjà insisté sur le fait que, pour de bons milieux de culture comme le Milieu de YOUNG et le Milieu de LÖWENSTEIN, connus pour bien conserver les caractères des souches, la réaction de DUBOS restait égale à elle-même durant fort longtemps.

Il en va très différemment lorsqu'on cultive les Mycobactéries pathogènes sur milieux pauvres.

Cinq souches virulentes repiquées sur Eau peptonée

glycérinée à 5 % se colorent beaucoup moins intensément que les témoins entretenues en milieu de YOUNG. Cette colorabilité s'atténue encore par des repiquages successifs et finit par disparaître ; nous avons noté à propos de la virulence-cobaye, dans un cas, ce qu'il fallait penser de cette disparition de la réaction de DUBOS.

Nos souches homogènes : S.A.P.C. Humaine CHATTOT, Bovine K entretenues au Laboratoire depuis de nombreuses années sur ce milieu ne se colorent plus par le Rouge Neutre et ne tuberculisent plus le cobaye.

Si l'on prend un milieu de culture plus pauvre encore comme l'eau ordinaire stérilisée, où le bacille tuberculeux pousse avec parcimonie, comme l'a bien montré A. DUFORT [18], l'affinité tinctoriale pour le Rouge Neutre disparaît encore plus vite, comme nous avons pu le constater pour 12 souches qui avaient bien voulu pousser sur ce milieu ; dès le deuxième repiquage, elle a entièrement disparu.

C) LES AGENTS THÉRAPEUTIQUES.

Nous serons extrêmement bref sur cette question qui nous a pourtant demandé de nombreux essais comparatifs. La Streptomycine, l'acide Para-amino-salicylique, l'amide de l'acide isonicotinique mis en présence de bacilles virulents à des doses nettement supérieures à leur taux de résistance pendant des délais variables allant jusqu'à quinze jours, ne modifient en rien la réaction de DUBOS des bacilles.

De même les bacilles, résistants à ces différents agents, ne nous ont pas paru présenter de modifications particulières de la réaction de DUBOS.

D) ÂGE DES BACILLES.

Nous en arrivons maintenant à l'importante question de l'âge des bacilles.

On voudra bien se souvenir que dans les premiers chapitres de ce travail lorsque nous envisagions les variations de la réaction de DUBOS suivant les souches et sa fixité dans le temps, nous prenions la précaution de noter l'âge de nos cultures. Nous agissions ainsi en raison de constatations que nous avons faites très tôt au cours de notre étude sur la réaction de DUBOS [5] et que, pour plus de clarté, nous groupons ici :

1° *Examen des colonies par Réaction de Dubos classique.*

Nous avons grossièrement décrit dans la technique de la réaction, l'aspect des colonies colorées par le Rouge Neutre. Nous allons maintenant donner quelques détails afin de chercher à interpréter cet aspect.

En effet, il est surprenant, à première vue de constater que des bacilles forcément de même souche et de virulence *à priori* identique, ne présentent pas tous, avec une égale intensité, la réaction de DUBOS.

On pourrait admettre que le colorant imprégnant une plus grande masse de bacilles, sa métachromasie en rouge est plus nette sous une épaisseur plus forte. Mais à l'examen des longs filaments mycéliens, nous voyons qu'en réalité, même une petite épaisseur de bacilles révèle sa métachromasie éventuelle en rouge et que, seules les extrémités libres des colonies, les segments éloignés du centre des colonies, ne présentent pas la coloration de l'ensemble. Or ces bacilles distaux des colonies sont sûrement les plus récemment formés et l'on peut en conclure que les bacilles appartenant à une souche virulente, mais jeune, ne donnent pas la réaction de DUBOS.

Cette observation est confirmée par la réaction de DUBOS sur colonie repérée.

2° *Examen de Dubos sur colonie repérée.*

Nous avons décrit l'aspect des colonies au chapitre précédent. Rappelons que l'étude d'une colonie dans ces

conditions n'est possible que si la lamelle comprime légèrement les bacilles. En outre, si des différences tinctoriales devaient se voir, attribuables à la technique, c'est le centre des colonies plus mal imprégné par le colorant qui devrait présenter la teinte la plus faible. Nous avons vu qu'il n'en était rien et que du reste pour les colonies filamenteuses, les bacilles périphériques ne se coloraient pas non plus, alors que les bacilles centraux se colorent.

De plus, des colorants indifférents à la virulence microbienne tels que le Bleu de Méthylène ou le Violet de Gentiane, se comportaient de toute autre façon, et les premiers éléments colorés sont bien dans ce cas les éléments périphériques et non les éléments centraux. On pourrait songer à prévoir le stade de croissance des colonies de Mycobactéries en cherchant le pourcentage des bacilles colorés en rouge par rapport à la totalité des bacilles. Mais ce n'est pas possible puisque l'aspect des colonies en début de pousse, donc formées de bacilles relativement âgés et rouges est en somme identique à celui des colonies en fin de croissance formées elles aussi de bacilles relativement âgés.

Pour étudier de plus près cette influence de l'âge des bacilles sur leur colorabilité par le Rouge Neutre, nous avons compté à intervalles de temps égaux, durant une poussée microbienne le pourcentage de bacilles rouges des colonies par rapport aux bacilles totaux, en pratiquant bien entendu ces numérations sur plusieurs colonies chaque fois. Parallèlement à cette étude, nous établissons la courbe de croissance du germe.

Voici le protocole de chacune de ces expériences :

— une souche estensemencée dans une fiole de VIVIAN contenant 50 centimètres cubes de milieu de YOUNG, sérum de cheval, et placée à l'étuve. Les fioles sont agitées journellement pour éviter la formation d'amas microbiens trop importants. Deux à cinq jours plus tard commencent les mesures. Une partie du contenu du ballon,

2 cc. est prélevée et le ballon remis à l'étuve. Nous n'enlevons ainsi chaque fois qu'une partie aliquote du liquide ne modifiant pas la concentration actuelle des germes dans le milieu.

Le liquide prélevé est rapidement placé dans une cuve d'électrophotomètre et nous mesurons ainsi la croissance par néphelemétrie.

Nous ne nous dissimulons pas du reste les inconvénients de ce procédé : les colonies de *Mycobactéries* sont relativement grosses et les conditions optiques d'une bonne néphelemétrie, vraiment quantitative ne sont pas réalisées. On s'expose à la sédimentation des colonies ce qui exige une mesure rapide. On peut du reste réémulsionner les bacilles par retournement de la cuve et recommencer une mesure qui a paru trop lente.

Toutefois nos courbes de croissance se sont avérées assez régulières.

Cette mesure de croissance effectuée, on utilise alors le liquide contenu dans la cuve pour effectuer une réaction de DUBOS classique.

Le culot de centrifugation final étant mis en place sous le microscope, on s'est attaché à compter les bacilles rouges et les bacilles non colorés sur plusieurs colonies (une dizaine chaque fois). On en déduit le pourcentage de bacilles colorés. Nous portons alors sur le même graphique les résultats des mesures de croissance et le pourcentage des bacilles colorés. L'axe des abscisses représente le temps exprimé en jours.

L'axe des ordonnées ne porte qu'une échelle correspondant à la croissance, en effet, nous aurions pu faire une échelle des ordonnées double portant aussi le pourcentage des bacilles colorés. Nous avons préféré n'indiquer que l'échelle des croissances et tracer la courbe représentative de la croissance globale d'une part, et, d'autre part, une courbe dont chaque point a pour ordonnée la fraction représentative des seuls bacilles colorés et se trouve par conséquent sur la même abscisse

que le point de la courbe de croissance dont l'ordonnée représente les bacilles totaux. Par exemple, si l'électrophotomètre nous indiquant la division 100 et la numération 50 % de bacilles colorés au jour X, nous plaçons le point de la courbe de croissance sur l'abscisse X à l'ordonnée 100 et le deuxième point sur l'abscisse X à l'ordonnée 50.

Cette deuxième courbe représente en somme la courbe, nous ne dirons pas de croissance, mais de présence des bacilles colorés en fonction du temps, en supposant que nous ayons pu utiliser le même procédé pour numérer les germes totaux et les seuls germes colorés.

Nous avons ainsi établi 18 courbes doubles qui se ramènent suivant la courbe de croissance à trois types principaux, déjà du reste notés par M. W. FISHER, W. F. KIRCHHEIMER, A. R. HESS [19-20].

Le premier type (figure IV) (10 souches) correspond à un ensemencement de bacilles provenant de culture ancienne — vieille (50-60 jours de culture) ou à un chan-

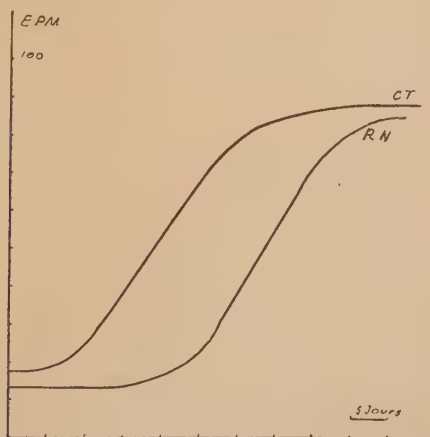


FIG. IV. — Souche H. Cob. Mir., M. de Youmans.

gement de milieu (LÆWENSTEIN sur YOUNANS, par exemple) c'est-à-dire passage d'un milieu solide sur milieu liquide. Dans ce cas, comme on le voit, on a une courbe de crois-

sance tout à fait classique avec une phase de latence plus ou moins longue, suivie d'une courbe de croissance pseudo-logarithmique, suivie d'une phase de ralentissement et d'arrêt de la pousse. Nous n'avons pas conduit l'examen de la courbe plus de 50 jours en raison de la diminution de la quantité de milieu de culture dans les ballons.

Le deuxième type (4 souches) est exactement semblable au point de vue croissance. L'aspect est différent seulement en ce qui concerne la courbe des bacilles colorés par le Rouge Neutre. En effet dans le premier type, cette courbe nous montre un accroissement numérique régulier

FIG. V

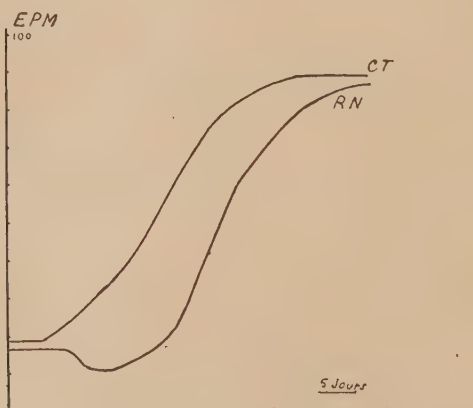


FIG. V. — Souche H. Cob. Chan., M. de Youmans.

des bacilles colorés par le Rouge Neutre, à partir du pourcentage initial de bacilles colorés. Cet accroissement suit un tracé qui n'est en rien comparable au tracé de la croissance globale : la phase de latence apparaît beaucoup plus longue, la phase de croissance exponentielle est donc retardée par rapport à la même phase de la croissance globale, en d'autres termes, il apparaît qu'au démarrage de la croissance, la multiplication bacillaire donne naissance à des bacilles ne prenant pas le Rouge Neutre, l'ap-

parition de cette aptitude tinctoriale, ainsi que le montre le décalage des courbes n'est pas contemporaine de la division bacillaire, mais se trouve retardée, comme si dans une première phase les bacilles se divisaient et dans une seconde phase acquéraient, disons, leur virulence.

Dans la phase de ralentissement de la pousse, au contraire, les bacilles déjà formés complètent leur maturation et l'acquisition des propriétés tinctoriales qui nous intéressent ici étant plus rapide que la division bacillaire, les deux courbes tendent à se rejoindre.

Dans le deuxième type de courbe que nous présentons, le phénomène est encore plus net. Ce type concerne des bacilles dont la pousse, après une certaine phase de latence, s'est montrée extrêmement rapide. On ne manquera pas d'être frappé par le point d'inflexion qu'on remarque sur la deuxième courbe, concernant les bacilles colorés. Il apparaît en effet, alors que la pousse bacillaire est déjà commencée et active que le nombre des bacilles colorés est inférieur à ce qu'il était au début de l'expérience, ce qui s'explique aisément si l'on admet que la plupart des bacilles introduits ont été capables de se diviser, mais que la reprise de la croissance et la division des bacilles adultes introduits leur a fait perdre leurs propriétés tinctoriales.

Les deux types de courbes que nous venons d'examiner nous montrent que la réaction de DUBOS, pour les souches tout au moins qui présentent cette réaction, apparaît comme un test de maturation des bacilles qui s'efface lorsque les bacilles entrent en phase de croissance ou de division.

Le troisième type (4 souches) de courbe de croissance que nous présentons se rencontre lorsqu'on repique des bacilles jeunes, déjà adaptés par plusieurs repiquages au milieu liquide utilisé.

Dans ce cas, la phase de latence n'est pas visible, on n'observe que la phase exponentielle et la phase de ralentissement de la courbe de croissance, on retrouve le même

décalage de la courbe de croissance globale et de la courbe des bacilles colorés, qui se rejoignent lorsque la croissance est arrêtée.

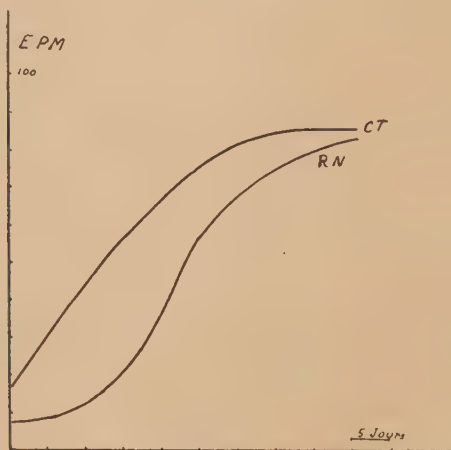


FIG. VI. — Souche H. 37 Rv, M. de Youmans.

Bien entendu, tous les intermédiaires sont possibles outre ces trois types de courbes et nous n'avons choisi que les plus caractéristiques.

Là encore, les résultats sont conformes aux données de l'examen morphologique. L'apparition de la réaction de DUBOS n'est pas contemporaine de la multiplication bacillaire et nous tenons à rapprocher ces résultats de ceux obtenus par A. NÈGRE. Cet auteur, en effet, a obtenu des durées de survie variables chez le cobaye, en inoculant la même souche à des âges différents. Il indique que les bacilles jeunes lui paraissent moins virulents que les bacilles mûrs.

En nous plaçant à un point de vue pratique d'utilité plus immédiate il nous paraît alors indispensable pour tester la virulence cytochimique d'une souche de s'adresser à une culture suffisamment âgée pour que l'on puisse être assuré de trouver des bacilles mûrs et sans valeur de comparer la réaction de DUBOS de deux souches d'âges différents.

CHAPITRE VI

HYPOTHESES SUR LE MECANISME DE LA REACTION DE DUBOS

Nous serions beaucoup mieux éclairés sur la Réaction de DUBOS, même en ce qui concerne sa valeur comme test de virulence et plus encore, en ce qui concerne ses variations possibles, si nous connaissions bien le lien qui unit le virage de ce colorant : le Rouge Neutre, fait matériel, tangible, à la virulence, concept abstrait dont on n'atteint guère, en ce qui concerne les Mycobactéries qu'un seul facteur : le pouvoir pathogène expérimental. La connaissance de ce lien nous serait donnée par celle du mécanisme intime de la réaction de DUBOS.

Nous allons voir que deux grandes hypothèses nous ont été proposées.

Il semble que la première hypothèse proposée ait été celle d'ASSELINEAU et LEDERER (loc. cité) qui, au cours d'une étude sur les lipides des bacilles tuberculeux, nous dit que l'acide mycolique libre des cires et un « lipopolysaccharide azoté et phosphoré, à haut point de fusion », représentant tous deux des produits extractifs, présentaient la réaction de DUBOS et pourraient être le substrat de cette réaction.

L'autre hypothèse soutenue par DESBORDES et FOURNIER [17] est fondée sur cette remarque que le Rouge Neutre est un indicateur Redox jauni sous la forme réduite, rouge sous la forme oxydée. Et dès longtemps en effet, le Rouge Neutre est bien connu comme colorant vital et comme indicateur Redox.

DESBORDES et FOURNIER laissent entendre que cette coloration pourrait dépendre d'un potentiel d'oxydo-réduction intra-cellulaire différent suivant les souches utilisées et dépendant de « l'équipement enzymatique initial ».

Comparons les faits observés et cette hypothèse :

Nous sommes surpris de voir des bacilles tués, conserver un tel potentiel d'oxydoréduction intracellulaire. Nous avons vu les nôtres conserver ce potentiel jusqu'à trente jours après leur mort. On pourrait penser que ce potentiel, au bout de ce temps pourrait s'équilibrer avec celui du milieu extérieur. Admettons que la capsule cireuse des Mycobactéries protège remarquablement ces dernières, il n'en reste pas moins que, de toute nécessité, des échanges doivent rester possibles, au travers de cette dernière. Enfin nous avons eu l'occasion d'examiner une souche morte, vicille de trois ans qui gardait sa colorabilité.

DESBORDES et FOURNIER [22], se fondant sur une réaction analogue à celle de DUBOS, qu'ils ont mise au point : la réaction au Bleu de Nil, pensent qu'il faut attribuer une grande importance à la cinétique de la réaction : dans le cas du Bleu de Nil, ces auteurs montrent qu'il y a d'abord coloration en bleu des bacilles, correspondant à la forme oxydée du Bleu de Nil, puis « mé'achromasie » des bacilles devenant incolores, correspondant à la forme réduite du Bleu de Nil. On ne nous précise pas ce qui se passe pour les bacilles tués.

Mais DESBORDES et FOURNIER nous apportent bien d'autres éléments troublants :

BLOCH [23-24] a décrit un procédé permettant de tester la virulence des Mycobactéries en mesurant en tubes de THUNBERG la vitesse de décoloration du Bleu de Méthylène. Il nous apprend que le Bleu de Méthylène est beaucoup plus rapidement réduit en son leuco-dérivé par les bacilles avirulents qu'il ne l'est par les bacilles virulents.

DESBORDES et FOURNIER [17] reprennent ces expé-

riences et, toujours en tubes de THUNBERG, recherchent si, au bout d'un temps donné le dichloro-indo-phénol et le Bleu de Méthylène sont réduits. Il apparaît alors que le dichloro-indo-phénol dont le rH est plus élevé que celui du Bleu de Méthylène, est plus rapidement réduit que le Bleu de Méthylène par les bacilles avirulents.

Dans le même temps, les bacilles virulents ne réduisent que le dichloro-indo-phénol.

Autrement dit : puisque le virage du dichloro-indo-phénol dont le rH est plus élevé que celui du Bleu de Méthylène, c'est-à-dire puisque ce colorant est plus sensible à la réduction, il faut en conclure que les bacilles avirulents ont une activité respiratoire plus grande que les bacilles virulents.

On retrouve là simplement par l'emploi des indicateurs Redox colorés, des faits très anciennement connus. Qu'il nous suffise de rappeler que la grande activité respiratoire des bacilles avirulents est à la base de la découverte de LEHMANN.

Mais DESBORDES et FOURNIER, en avaient conclu que, dans la réaction de DUBOS, le mécanisme devait être aussi un phénomène du même ordre.

Or, nous ne pensons pas pouvoir accepter cette conclusion sans faire remarquer au préalable que, dans les expériences de BLOCH comme dans celles de DESBORDES et FOURNIER, les conditions sont totalement différentes de celles de la réaction de DUBOS.

BLOCH, DESBORDES et FOURNIER utilisent des tubes de THUNBERG, c'est-à-dire que leurs expériences sont conduites en l'absence d'oxygène moléculaire. Ils constatent un virage sur le liquide surnageant. Or, dans la réaction de DUBOS, faite à l'air libre, on ne peut — il est aisé de le vérifier — obtenir de virage. Dans les mêmes conditions de pH le Bleu de Méthylène ne se décolore que très difficilement dans une zone restreinte située au-dessus des bacilles et à condition d'opérer dans de longs tubes étroits. Du reste, dans la réaction de DUBOS, on s'intéresse aux bacilles et non au liquide surnageant.

Néanmoins, pour nous placer dans des conditions expérimentales semblables, nous avons tout d'abord choisi quatre colorants :

Le Bleu de Méthylène	rH = 14
Le Bleu de Nil	rH = 10 - 9
Le Vert Janus (Vert Visba B) ..	rH = 6
Le Rouge Neutre	rH = 3

Précisons que le Vert Visba B a deux formes réduites, une forme rouge, dont on a indiqué la zone de demi-virage réversible et une forme incolore, irréversible, dont le rH de formation est voisin de celui du Rouge Neutre. Notons aussi le rH très bas du Rouge Neutre ; ce dernier ne vire que dans les milieux très réducteurs.

Nous avons mis ces quatre colorants en solutions équimoléculaires à 0,05 M dans deux solvants différents : La solution de YOUMANS qui nous sert pour nos cultures, solution tamponnée à pH 6,8 environ d'une part, dans le tampon à pH 8,9 qui nous sert pour les réactions de DUBOS d'autre part.

On a rempli des tubes de THUNBERG avec diverses souches de bacilles tuberculeux, croissance achevée. Pour chaque souche on étudiait chaque fois les quatre colorants, dans les deux milieux.

Le poids sec à 37° des bacilles était de l'ordre de 50 milligrammes.

Le volume total de 5 cc.

La température de 37°5.

Nous avons effectué deux séries de recherches.

Nous avons recherché le potentiel limite d'oxydo-réduction sans prolonger du reste l'observation plus de trois jours pour éviter que la cytolyse ne vienne modifier les résultats, comme il est classique, en diminuant le potentiel d'oxydo-réduction et la vitesse de décoloration des indicateurs.

Nous avons étudié, à plusieurs reprises, 10 souches de bacilles (5 virulentes, 5 avirulentes).

Dans le cas des bacilles avirulents, à pH 8,9, nous n'avons rien constaté dans le tube contenant le Rouge Neutre, comme il fallait s'y attendre, le colorant surnageant étant sous la forme réduite et les bacilles non colorables.

Dans le cas des bacilles virulents à pH 8,9, nous avons bien constaté, dans les 20 première minutes, une coloration en rouge des bacilles mais elle a disparu entre 48 et 72 heures. Ces bacilles ont donc un rH intracellulaire inférieur à celui du Rouge Neutre.

Bien entendu dans les deux cas tous les autres indicateurs s'étaient décolorés.

Lorsque nous nous sommes placé à pH 6,8 les conditions étaient entièrement différentes de celles de la réaction de DUBOS puisque le Rouge Neutre avait là sa forme rouge, donc oxydée.

Nous avons alors examiné le liquide surnageant et les bacilles.

Dans tous les cas, le Rouge Neutre a viré au jaune, dans le liquide surnageant mais avec des temps différents :

- pour les bacilles avirulents entre 36 et 48 heures ;
- pour les bacilles virulents entre 48 et 72 heures.

En ce qui concerne les bacilles, à 6 pH, les bacilles avirulents aussi étaient colorés en Rouge et ils se sont secondairement décolorés six heures environ avant que le milieu soit complètement éclairci.

Il en était de même pour les bacilles virulents.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

SOUCHES		COLORANTS			
		BLEU DE MÉTHYLÈNE	BLEU DE NIL	VERT VISBA B	ROUGE NEUTRE
pH 8,9	avirulentes	Bleu décol. 18 H.	Bleu décol. 18 H.	Bleu 36 H. rose moins de 48 H. décol. 72 H.	jaune après 72 H. bacilles non colorés
	avirulentes	Bleu décol. 24 H.	Bleu décol. 24 H.	Bleu 36 H. encore rose après 48 H. décol. 24 H. environ	jaune après 72 H. bacilles rouges avant 48 H. jaunes après 72 H. virage dans l'intervalle
pH 6,8	virulentes	Bleu décol. 18 H.	Bleu décol. 18 H.	Bleu 24 H. rose moins de 36 H. décol. moins de 48 H.	liquide rouge après 48 H. jaune après 48 H. bacilles non colorés
	virulentes	Bleu décol. 18 à 24 H.	Bleu décol. 18 à 24 H.	Bleu plus de 36 H. rose après 48 H. décol. 72 H. environ	liquide rouge avant jaune après 72 H. bacilles rouges avant 48 H. jaunes après 72 H.

Ces expériences nous ont inspiré plusieurs remarques :

Il est bien exact que les bacilles avirulents ont une respiration plus active que les bacilles virulents ; mais il ne semble pas que leur système respiratoire soit fondamentalement différent de celui des bacilles virulents puisque leur potentiel limite d'oxydoréduction est pour les deux types de bacilles, supérieur au potentiel de virage du Rouge Neutre.

La réaction de DUBOS qu'on ne rencontre que chez les Mycobactéries, ne résulte pas, à première vue, d'une singularité du potentiel Redox de ces dernières, puisque les Mycobactéries se comportent sur ce point comme la plupart des germes aérobies.

Si les Mycobactéries pathogènes et non pathogènes diffèrent par des phénomènes de réduction mis en évidence par le Rouge Neutre, on peut s'expliquer que les germes non virulents, dont l'activité respiratoire est élevée, réduisent le Rouge Neutre ou tout au moins le laissent à l'état réduit ; mais comment admettre que dans la réaction de DUBOS où le Rouge Neutre est à l'état réduit, les bacilles virulents ont, au contraire, le pouvoir de l'oxyder sous sa forme Rouge.

Remarquons de même que, pour les courbes de croissance que nous présentons plus haut, il est habituel de voir les germes en phase de croissance présenter une activité respiratoire plus élevée qu'à l'état de « resting-bacteria ». On peut donc comprendre que les germes virulents jeunes, respirant beaucoup, comme les germes avirulents, laissent le Rouge Neutre à l'état réduit, donc jaune ; mais on ne comprend toujours pas pourquoi à un moment donné, ils oxydent le Rouge Neutre sous sa forme rouge.

Ces expériences et celles de DESBORDES et FOURNIER ont du moins le mérite de mettre en évidence sur un fait :

Le Rouge Neutre, indicateur Redox, peut être sensible à l'action réductrice des Mycobactéries, dans certaines conditions qui sont principalement l'anaérobiose de lon-

gue durée. Dans l'impossibilité où nous sommes de séparer les différents corps, pouvant agir sur le Rouge Neutre pour le faire virer, on peut donc penser que le potentiel Redox des bacilles peut intervenir, mais on doit reconnaître qu'il ne suffit pas à lui seul pour expliquer le mécanisme de la réaction de DUBOS.

Toutefois, étudiant la réaction au Bleu de Nil, dont la technique est tout à fait comparable à celle de la réaction au Rouge Neutre (choix d'un tampon alcalin additionné de Bleu de Nil — virage par les bacilles virulents — pas de virage par les bacilles avirulents), DESBORDES et FOURNIER ont essayé de généraliser le problème et après avoir étudié plusieurs colorants ils formulent presque — si nous avons bien compris leur pensée — une règle pour découvrir des réactions similaires :

— Choisir un colorant vital sensible au pH.

— Le placer en zone de virage alcalin — pour un pH suffisamment alcalin, variable pour chaque colorant, seuls les bacilles virulents ont le pouvoir de faire virer ce colorant.

Il n'est plus question d'oxydoréduction.

Et ces auteurs concluent qu'« il est probable que les groupements acides libres des cires fixent le colorant et déterminent son virage ».

C'était mettre l'accent sur ce fait fondamental que le Rouge Neutre, indicateur de pH, est sensible à des groupements acides sans qu'il soit nécessaire pour expliquer son virage de faire intervenir les potentiels Redox.

Il reste donc à apporter la preuve directe de cette hypothèse. Elle nous avait été fournie depuis longtemps déjà par ASSELINEAU et LEDERER. En effet en 1949 et en 1950, ASSELINEAU et LEDERER, étudiant les lipides du bacille tuberculeux, avaient démontré que l'acide mycolique libre et un lipopolysaccharide azoté et phosphoré à haut point de fusion présentaient la réaction de DUBOS.

Si nous examinons cette nouvelle explication du mécanisme de la réaction de DUBOS par rapport aux faits observés, on voit que rien ne s'oppose à ce que des bacilles morts conservent sous la forme de l'acide mycolique et du polysaccharide cité plus haut le « souvenir » de leur virulence passée.

En effet le pouvoir pathogène des germes peut parfaitement être lié à la présence de ces substances dans le corps bacillaire, sans même du reste qu'elles interviennent directement dans la pathogénie des lésions. On s'explique ainsi, aisément que des bacilles tués mais non lyzés conservent leur aptitude tinctoriale.

L'aspect morphologique différent des bacilles jeunes et des bacilles âgés a du reste été mis en évidence en ce qui concerne la coloration de ZIEHL par BESANÇON et PHILIBERT les premiers, puis par F. ARLOING et MALATRE en 1929, par HAUDUROY, par Morton C. KAHN, par D.-K. WEISFEILER et bien d'autres auteurs. Il s'agit là de faits bien établis et trop connus pour qu'on puisse être surpris de retrouver le même phénomène à propos de la réaction de DUBOS. Ils ont leur explication dans la composition différente des bacilles en lipides et les expériences de COURMONT sur les bacilles nus et de N. CHOUCROUN sur les bacilles délipidés sont venus étayer cette façon de voir.

Par conséquent les explications proposées par ASSELINEAU et LEDERER entrent bien dans les conceptions classiques concernant les variations de colorabilité des Mycobactéries.

Ces mêmes expériences montrent aussi les propriétés différentes des bacilles récemment formés, immaturés, des colonies et des bacilles mûrs. Cette différence de propriétés n'est pas, du reste, propre aux Mycobactéries et, pour ne citer que des faits très simples, on connaît l'apparition retardée des pigments de Staphylocoque doré, des bacilles pyocyaniques des toxines diphtériques et botuliniques, des antigènes du bacille de Bordet-Gengou.

Cette apparition à une phase donnée du cycle évolutif des bactéries, de telle ou telle substance donnée, nous croyons l'avoir retrouvée, en particulier en établissant nos courbes de croissance microbienne. La preuve directe de ce fait nous a été apportée par ASSELINEAU et LEDERER, lorsque J. VIALIER et nous-même avons affirmé que les bacilles jeunes ne se coloraient pas aussi intensément que les bacilles plus âgés, ces auteurs ont repris leurs essais sur des bacilles d'âges différents. Ils ont ainsi démontré que la teneur en acide mycolique et en « polysaccharide azoté et phosphoré » était moins élevée dans les bacilles tuberculeux jeunes et immatures que dans les bacilles plus âgés.

Nous avons vu aussi que A. NÈGRE pensait que la virulence des bacilles jeunes était moins forte que celle des bacilles mûrs. Et ainsi se trouve finalement établi le lien qui unit le Rouge Neutre à certaines fractions des cires et des lipides à la virulence.

Pour résumer en quelques mots les arguments que nous venons de présenter, il semble donc établi que la réaction de DUBOS est due à des substances définies agissant par des groupements acides, présentes dans le corps bacillaire, sans préjuger d'interréactions possibles, au rang desquelles on peut placer peut-être les phénomènes d'oxydoréduction. Ces substances ne sont pas du reste le seul facteur de la virulence, puisque des bacilles tués gardent la même réaction de DUBOS. Elles ne sont que le témoin de la virulence sans en être la cause unique.

C'est sur ces dernières lignes que nous désirons achever ce travail.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié la réaction cytochimique de la virulence de DUBOS sous divers aspects :

— *La spécificité* : nous a paru suffisante, sous certaines conditions que nous nous sommes efforcé de préciser.

— La confrontation avec la *virulence sur le Cobaye* comporte des exceptions, mais à une concordance en général telle, que l'on peut admettre la réaction de DUBOS comme un test biologique de virulence.

— *La Réaction varie* en fonction du milieu de culture et de l'âge des bacilles.

— *Son mécanisme* encore discutable peut être attribué, sur les données actuelles, à la présence de certains groupements acides des cires, sans préjuger du reste de l'intervention possible d'autres facteurs.

Vu :
Le Doyen,
HERMANN.

Vu :
Le Président de la Thèse,
SÉDALLIAN.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 20 Mai 1953

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

1. — DUBOS (R.) et MIDDLEBROOD (Y.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1948, 58, 698.
2. — HAUDUROY (P.) et POSTERNACK-GALLIA (Y.). — *Ann. Inst. Past.*, 1949, 77, 91.
3. — DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et GUYOTJEANNIN. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, 9, 151.
4. — VIALLIER (J.) et TIGAUD (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 402.
5. — INGRAO (F.) et VETÈRE (C.). — *Ann. del Ist. Carlo Forlanini*, 1952, 13-4, 333.
6. — AUDRADE (S. de). — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz-Braz*, 1951, 49-7, 32.
7. — VIALLIER (J.), KALB (J.-C.) et TIGAUD (J.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 62, 632.
8. — VIALLIER (J.) et TIGAUD (J.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 281.
9. — VIALLIER (J.) et TIGAUD (J.). — *J. Med. Lyon*, 1950, 743, 1075.
10. — RICHMONT (L.) et CUMMINGS (M.-M.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1950, 62, 632-638.
11. — BERGERON (A.) et MEZIERES (Mlle). — *Rev. de la Tub.*, 1937, 5-3, 514.
12. — BERGERON (A.) et LAVAGNE-MEZIERES (Mme). — *Rev. de la Tub.*, 1950, 19, 694.
13. — BOQUET (A.). — *Rev. de la Tub.*, 1939, 9, 1011.
14. — DESBORDES (J.). — *Ann. Pharm. Franç.*, 1951, 9, 325.
15. — DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et GUYOTJEANNIN. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, 9, 151.
16. — ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — *C.R. Acad. Sc.*, 1949, 228, 781.

17. — DESBORDES (J.) et FOURNIER (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, 79, 211.
18. — DUFOURT (A.). — *C.R. Soc. Biologie*, 1928, 88, 37.
19. — FISHER (M.-W.), KIRCHHEIMER (W.-F.) and HESS (A.-R.). — *J. of Bacterio.*, 1951, 62, 319.
20. — FISHER (M.-W.) and KIRCHHEIMER (W.-F.). — *Am. Rev. of Tuberc.*, 1950, 66, 758.
21. — NEGRE (A.). — *Les lipoïdes du bacille tuberculeux*, Masson, 1949.
22. — PARAF (J.), DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et GUYOT-JEANNIN. — *Ann. Biol. Clin.*, 1952, 10-12, 557.
23. — BLOCH (H.). — *Bull. N.-Y. Acad. Med.*, 1950, 26, 506.
24. — BLOCH (H.). — *J. Exper. Med.*, 1950, 92, 507.
25. — ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — *C.R. Acad. Sc.*, 1950, 230, 142.

TABLE DES MATIERES

Introduction et Historique	13
CHAPITRE PREMIER. — Technique de la réaction de Dubos.	17
CHAPITRE II. — La spécificité de la réaction de Dubos et ses variations suivant les souches. Sa fixité dans le temps	25
CHAPITRE III. — Coloration de <i>Mycobacterium Tubercu-</i> <i>losis</i> par le Rouge Neutre et virulence du bacille pour le Cobaye	35
CHAPITRE IV. — Comparaison entre la marche de la colo- ration par le Rouge Neutre avec la coloration des <i>Mycobactéries</i> par d'autres colorants	43
CHAPITRE V. — Variations de la réaction de Dubos	49
CHAPITRE VI. — Hypothèses sur le mécanisme de la réac- tion de Dubos	61
Conclusions	71
Bibliographie	73

